

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS  
CASCAS DOS FRUTOS DO CAMBUÍ-ROXO (*Eugenia  
candolleana DC*) E DO BACUPARI (*Garcinia brasiliensis Mart.*).**

**KARLA LIRIO SOARES**

**VILA VELHA - ES**  
**MAIO/2023**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS  
CASCAS DOS FRUTOS DO CAMBUÍ-ROXO (*Eugenia  
candolleana DC*) E DO BACUPARI (*Garcinia brasiliensis Mart.*).**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

**KARLA LIRIO SOARES**

**VILA VELHA - ES**  
**MAIO/2023**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S976c

Soares, Karla Lirio.

Caracterização química e atividade biológica das cascas dos frutos do cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e do bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) / Karla Lirio Soares. – 2023.

88f.: il.

Orientador: Rodrigo Scherer.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Vila Velha, 2023.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Estresse oxidativo.  
3. Antioxidante. 4. Rins – Doença. I. Scherer, Rodrigo.  
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

**KARLA LIRIO SOARES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS  
DOS FRUTOS DO CAMBUÍ-ROXO (*Eugenia candolleana* DC) E DO  
BACUPARI (*Garcinia brasiliensis* Mart.).**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de maio de 2023,

Banca Examinadora:



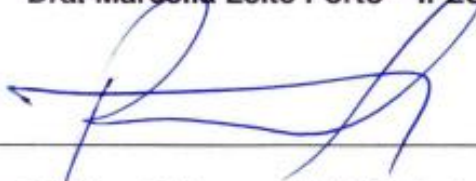
**Dra. Carmem Luiza Sartório – UVV**



**Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – UVV**



**Dra. Marcella Leite Porto – IFES**



**Dr. Rodrigo Scherer – UVV (Orientador)**

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem,  
e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto.”

Isaías 41:20

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus toda honra e toda glória para sempre! Fiel, presente, consolador e amigo. Sua graça me trouxe até aqui.

À minha mãe Ednéa por todo amor e todas as orações, porque você estava de joelhos eu estou de pé.

À minha irmã Kamila, de quem tenho tanto orgulho. Sou muito grata por nossa amizade e companheirismo.

Ao meu pai José Carlos por tanto amor, suporte, apoio e junto da minha madrastra Conceição sempre acreditarem em mim.

A minha madrinha Luciana, primeira mestre da família, quem me apresentou o mundo da pesquisa e ao trabalho em laboratório. Sou grata por ser além de afilhada, amiga.

A minha vó Yolanda, com quem reaprendi sobre amor e cuidado durante sua estadia em minha casa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo por toda orientação, ensino, incentivo, correções e pela compreensão durante os momentos difíceis que vivi.

Aos amigos que fiz em 8 anos de Lab 30, hoje LABCROM, em especial Mayara, Nathacha, Leandra, Débora, Carol, Camile, Paty, Thiago, Arthur, Matheus, Dani e Fernandinho, presentes que Deus me deu e que vou levar comigo para sempre.

Aos amigos de outros laboratórios que a pós me proporcionou, Mari, Antônio, Flávia e Ana Claudia.

Às minhas parceiras de tratamento dos animais, Sthephany e Helena, com toda paciência me ensinaram e me ajudaram de forma tão prestativa no cuidado dos animais. Compartilhamos momentos desafiadores.

Ao laboratório LFFT na UVV por toda ajuda nos ensaios *in vivo*, em especial, ao prof Dr. Thiago pela orientação, disponibilidade e apoio. Também as meninas que tanto me ajudaram, Glauci, Larissa, Rafa, Duda, Carmem, Débora, Talita e Profª Dra. Bianca.

A toda minha família e amigos que de perto ou de longe torcem por mim e acreditam em mim.

A todo corpo docente e funcionários da UVV que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de estudos e a FAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Óscar Núñez da Universitat de Barcelona, ao laboratório LUCCAR e de Histotécnicas da UFES e a Prof. Dra. Glória do IFES pelas contribuições nas análises.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa caminhada, essa vitória é nossa! Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1. Alimentação e saúde .....	16
2.2. Estresse oxidativo.....	18
2.3. Nefropatia induzida por contraste .....	21
2.3.1. Modelo murino de nefropatia induzida por contraste .....	23
2.4. Compostos fenólicos .....	24
2.5. Frutas da Mata Atlântica .....	26
2.5.1. Gênero <i>Eugenia</i> .....	27
2.5.2. Gênero <i>Garcinia</i> .....	30
<b>REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Caracterização química e atividade antioxidante <i>in vitro</i> de cascas dos frutos do cambuí-roxo (<i>Eugenia candolleana</i> DC) e do bacupari (<i>Garcinia brasiliensis</i> Mart)</b> .....	<b>41</b>
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
1.1. Objetivo geral .....	41
1.2. Objetivos específicos .....	41
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
2.1. Amostras .....	41
2.2. Caracterização química .....	42
2.2.1. Perfil de compostos por LC-MS/MS .....	42
2.2.2. Preparo dos extratos .....	42
2.2.3. Fenólicos totais.....	43
2.2.4. Conteúdo total de antocianinas monoméricas .....	43
2.2.5. Flavonoides totais.....	43
2.3. Atividade antioxidante .....	44
2.3.1. ABTS.....	44
2.3.2. DPPH.....	45
2.3.3. Peróxido de Hidrogênio.....	45
2.3.4. Superóxido.....	46
2.3.5. Óxido nítrico .....	46



2.4. Análise estatística.....	47
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
3.1. Caracterização química.....	47
3.2. Composição fenólica e atividade antioxidante.....	50
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Atividade nefroprotetora de extratos de cascas dos frutos do cambuí-roxo (<i>Eugenia candolleana</i> DC) e do bacupari (<i>Garcinia brasiliensis</i> Mart).....</b>	<b>60</b>
<b>1. OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
1.1. Objetivo geral.....	60
1.2. Objetivos específicos.....	60
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
2.1. Amostras.....	61
2.2. Preparação dos extratos.....	61
2.3. Ensaio de toxicidade oral aguda.....	61
2.4. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade nefroprotetora.....	62
2.4.1 Tratamentos e protocolo experimental.....	63
2.4.2. Análise bioquímica.....	63
2.4.3. Preparação do homogenato renal.....	64
2.4.4. Avaliação do estresse oxidativo através dos Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP).....	64
2.4.5. Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	65
2.4.6. Determinação dos níveis citoplasmáticos de ROS de células renais.....	65
2.4.7. Avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino.....	66
2.4.8. Histologia renal.....	67
2.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
2.5. Análise estatística.....	68
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>68</b>
3.1. Ensaio de toxicidade oral aguda.....	69
3.2. Análise bioquímica.....	70
3.3. Avaliação dos Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP). .....	71
3.4. Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	73
3.5. Determinação dos níveis citoplasmáticos de ROS de células renais.....	75

3.6. Avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino .....	76
3.7. Histologia renal.....	78
3.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	80
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2.....</b>	<b>86</b>

## RESUMO

SOARES, Karla Lirio, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, maio de 2023. **Caracterização química e atividade biológica das cascas dos frutos do cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e do bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.).** Orientador: Rodrigo Scherer.

Os benefícios do consumo de frutas têm sido associados com os compostos presentes nesses alimentos, como os compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante e capacidade de prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo. As espécies *Eugenia candolleana* (cambuí-roxo) e *Garcinia brasiliensis* (bacupari) ocorrem na Mata Atlântica, mas não possuem muitos estudos na literatura. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e a atividade biológica dos frutos do cambuí-roxo e do bacupari. As amostras foram coletadas no estágio maduro e depois as cascas separadas manualmente. A composição química foi analisada por UPLC-Orbitrap, o teor de fenólicos totais, flavonoides, antocianinas e atividade antioxidante foram analisadas por métodos químicos. Para análise *in vivo* foi utilizado o modelo animal de nefropatia induzida por contraste em camundongos suíços machos. Foram avaliados parâmetros bioquímicos, como a concentração sérica de creatinina e ureia, além de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, como determinação das concentrações de AOPP (produtos proteicos de oxidação avançada), TBARS (peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e concentrações citoplasmáticas de peróxido de hidrogênio. Também foi avaliado os danos ao DNA pelo ensaio do cometa e danos ao tecido renal através de análises de histologia e microscopia eletrônica de varredura. Como resultado, foram identificados compostos fenólicos como os flavonoides quercetina e epicatequina em ambas as amostras. O cambuí foi a fruta que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais (cambuí  $54,8 \pm 1,0$  mg/g de extrato; bacupari  $20,9 \pm 0,9$  mg/g de extrato), assim como maior atividade antioxidante em todos os métodos avaliados. Nos ensaios *in vivo*, foi observado que o modelo utilizado levou ao desenvolvimento da lesão renal (valores grupo NIC: ureia –  $188,32 \pm 16,82$ ; creatinina –  $0,63 \pm 0,08$ ), e os extratos das cascas dos frutos do cambuí-roxo e do bacupari preservaram a função renal, reduzindo os níveis séricos de creatinina (C10:  $0,36 \pm 0,05$  mg/dL; C100:  $0,32 \pm 0,05$  mg/dL; B100:  $0,34 \pm 0,03$  mg/dL) e ureia (C10:  $85,20 \pm 19,17$  mg/dL) e diminui o dano oxidativo sistêmico (AOPP plasma – NIC:  $0,31 \pm 0,07$   $\mu$ mol/mg de proteína; B10:  $0,13 \pm 0,01$   $\mu$ mol/mg de proteína; B100:  $0,15 \pm 0,01$   $\mu$ mol/mg de proteína) e local, se mostrando superior ao tratamento convencional com N-acetilcisteína. Além disso, os tratamentos preventivos com as frutas demonstraram efeitos antígeno-tóxicos e preservaram as estruturas renais, diminuindo as lesões glomerulares e tubulares renais nas análises histológicas. Sendo assim, no presente estudo foi possível verificar que as frutas analisadas possuem compostos fenólicos com atividade antioxidante. Também apresentou pela primeira vez que o tratamento profilático com o cambuí-roxo e o bacupari reduziu os danos renais causados pelo contraste, e que os compostos identificados nas frutas podem estar relacionados as atividades observadas. A utilização dessas frutas podem ser uma ferramenta promissora na prevenção da CIN.

**Palavras-chave:** Mata Atlântica; polifenóis; antioxidante; estresse oxidativo; lesão renal.

## ABSTRACT

SOARES, Karla Lirio, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, May, 2023. **Chemical characterization and biological activity of fruit peels cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) and bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.).** Advisor: Rodrigo Scherer.

The benefits of fruit consumption have been associated with the compounds present in these foods, such as phenolic compounds that have antioxidant activity and the ability to prevent diseases related to oxidative stress. The species *Eugenia candolleana* DC (cambuí-roxo) and *Garcinia brasiliensis* Mart. (bacupari) occur in the Atlantic Forest, but there are not many studies in the literature. Therefore, the objective of this work was to evaluate the chemical composition and biological activity of cambuí-roxo and bacupari fruits. Samples were collected at the mature stage and then the peels were manually separated. The chemical composition was analyzed by UPLC-Orbitrap, the content of total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity were analyzed by chemical methods. For *in vivo* analysis, the animal model of contrast-induced nephropathy in male Swiss mice was used. Biochemical parameters were evaluated, such as serum creatinine and urea concentrations, in addition to parameters related to oxidative stress, such as determination of AOPP concentrations (protein products of advanced oxidation), TBARS (lipid peroxidation through substances reactive to thiobarbituric acid) and concentrations cytoplasmic hydrogen peroxide. DNA damage was also evaluated by the comet assay and kidney tissue damage through histology and scanning electron microscopy analyses. As a result, phenolic compounds such as the flavonoids quercetin and epicatechin were identified in both samples. Cambuí was the fruit with the highest content of total phenolic compounds (cambuí  $54.8 \pm 1.0$  mg/g of extract; bacupari  $20.9 \pm 0.9$  mg/g of extract), as well as the highest antioxidant activity in all the methods evaluated. In *in vivo* tests, it was observed that the model used led to the development of kidney damage (NIC group values: urea –  $188.32 \pm 16.82$ ; creatinine –  $0.63 \pm 0.08$ ), and extracts from cambuí fruit peels -purple and bacupari preserved renal function, reducing serum creatinine levels (C10:  $0.36 \pm 0.05$  mg/dL; C100:  $0.32 \pm 0.05$  mg/dL; B100:  $0.34 \pm 0.03$  mg/dL) and urea (C10:  $85.20 \pm 19.17$  mg/dL) and decreases systemic oxidative damage (plasma AOPP – NIC:  $0.31 \pm 0.07$   $\mu\text{mol/mg}$  protein; B10:  $0.13 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/mg}$  of protein; B100:  $0.15 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/mg}$  of protein) and local, proving superior to conventional treatment with N-acetylcysteine. Furthermore, preventive treatments with the fruits demonstrated antigenotoxic effects and preserved renal structures, reducing glomerular and renal tubular lesions in histological analyses. Therefore, in the present study it was possible to verify that the fruits analyzed have phenolic compounds with antioxidant activity. It also presented for the first time that prophylactic treatment with purple cambuí and bacupari reduced kidney damage caused by contrast, and that the compounds identified in the fruits may be related to the observed activities. The use of these fruits can be a promising tool in preventing CIN.

**Keywords:** Atlantic Forest; polyphenols; antioxidant; oxidative stress; kidney injury.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma alimentação saudável e variada está relacionada a manutenção da saúde e prevenção de doenças, principalmente as doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças renais (TANGNEY; STAFFILENO; RASMUSSEN, 2017; WHO, 2022). Dentro da composição dessa alimentação, que varia individualmente de acordo com idade, sexo, atividade física, contexto cultural e disponibilidade de alimentos, existem princípios básicos, como a recomendação do consumo de pelo menos 400 g (ou seja, cinco porções) de frutas e legumes por dia (excluindo tubérculos e raízes amiláceas) (WHO, 2022).

O consumo diário desses alimentos é importante, pois além dos macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios), as frutas também são fontes de vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos que possuem diferentes atividades biológicas, como os compostos fenólicos por exemplo, que possuem propriedades antioxidantes (KASOTE et al., 2015; METSÄMUURONEN; SIRÉN, 2019).

Os compostos fenólicos são uma das principais classes de metabólitos secundários, amplamente distribuídos na maioria das frutas e vegetais (GANESAN; XU, 2017; SWALLAH et al., 2020). Possuem, em geral, em sua estrutura, ao menos um anel aromático com uma ou mais hidroxilas (OH) ligadas, podendo conter outros radicais como carboxilas, metoxilas, estruturas cíclicas não-aromáticas, entre outros (ELAZZOUZI et al., 2019; GARCÍA-PÉREZ; KASANGANA; STEVANOVIC, 2017). São divididos em duas classes e subclasses de acordo com sua estrutura, são elas: os compostos não flavonoides (ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e ligninas) e os compostos flavonoides (flavonóis, flavonas, flavononas, flavanóis, isoflavonas,

antocianinas e taninos condensados ou proantocianidina) (DURAZZO et al., 2019; TSAO, 2010).

Esses compostos estão relacionados com a cor, sabor e diversas atividades biológicas (RECIO; ANDUJAR; RIOS, 2012), destacando-se seu potencial antioxidante, atribuído, principalmente à sua capacidade de atuar como agente redutor, doador de hidrogênio, supressor de radicais livres e quelante de metais (ZAIDUN; THENT; LATIFF, 2018).

Justamente por essas características químicas e atividades antioxidante e anti-inflamatória, que esses compostos são capazes de prevenir ou retardar a progressão de doenças que se desenvolvem por mecanismos oxidantes e inflamatórios, como as doenças renais, por exemplo (AVILA-CARRASCO et al., 2021; BAO; PENG, 2016). Além disso, as principais fontes desses compostos são alimentos como frutas e vegetais, o que torna acessível essa ferramenta terapêutica promissora (AVILA-CARRASCO et al., 2021).

A composição de fenólicos nos vegetais variam de acordo com a espécie, maturação, condições de plantio (solo, clima, água), pós-colheita, partes da planta (casca, semente, folhas) entre outros fatores (SCHMIDT et al., 2019). Essas diferenças vão influenciar diretamente na sua atividade biológica (GRANATO et al., 2016; LEMOS et al., 2015, 2016).

A Mata Atlântica tem como característica sua biodiversidade, mas é um dos biomas mais devastados (DOS SANTOS et al., 2019). Portanto, torna-se importante para a preservação de espécies vegetais nativas avaliar seu conteúdo de compostos bioativos, assim como seu possível potencial contra doenças crônicas, a fim de

diversificar a dieta humana, para aplicação terapêutica e valorização da economia local de forma sustentável (ANUNCIACÃO et al., 2019; FIDELIS et al., 2019).

Espécies do gênero *Eugenia*, têm um vasto potencial econômico e farmacológico e uma vasta exploração comercial de suas frutas comestíveis, madeira, óleos essenciais e uso como plantas ornamentais. No Brasil, existem cerca de 400 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* distribuídas em todo o país, como a *Eugenia uniflora* (DE LIRA JÚNIOR et al., 2007), *Eugenia brasiliensis* (MARTINOTTO et al., 2008), *Eugenia candolleana* DC (SOBRAL et al., 2015), entre outras.

A *Eugenia candolleana* DC também conhecida como cambuí-roxo, cereja preta ou ameixa da Mata Atlântica, é uma espécie endêmica no Brasil, nativa da Mata Atlântica, ocorrendo em estados do Nordeste, Sudeste e Sul (SOBRAL et al., 2015). Estudo prévio, nosso grupo de pesquisa identificou diferentes fenólicos, atividade antioxidante e anti-inflamatória na semente e na parte comestível (polpa com casca) do cambuí-roxo (SOARES et al., 2022). Considerando a coloração intensa da casca, o presente estudo tem como objetivo avaliar a composição química e a atividade biológica da casca do fruto da *Eugenia candolleana* DC.

Outro gênero que tem demonstrado importante atividade biológica é o *Garcinia*, essas capacidades têm sido relacionadas a presença de compostos como benzofenonas, xantonas e flavonoides (GONTIJO et al., 2012; SANTA-CECÍLIA et al., 2011). Dentro deste gênero, destaca-se a *Garcinia brasiliensis* Mart., que apesar de ser nativa da região Amazônica, é encontrada em parte da Mata Atlântica (CORRÊA; PENA, 1984). Estudos com a casca de *Garcinia brasiliensis* Mart. mostraram um efeito anti-obesidade (MOREIRA et al., 2017), modulando a microbiota intestinal, diminuindo o stress oxidativo e inflamação em ratos obesos (ARAÚJO et al., 2019). Além disso,

suas folhas também apresentaram importante atividade antioxidante e antimicrobiana (NAVES et al., 2019) e anti-inflamatório *in vivo* (SANTA-CECÍLIA et al., 2011). Apesar de vários estudos demonstrarem suas propriedades biológicas, não foram encontrados estudos que avaliaram a atividade antioxidante de diferentes métodos *in vitro* de extratos etanólicos do bacupari, assim como não foram encontrados estudos avaliando a atividade nefroprotetora *in vivo* desse fruto.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Alimentação e saúde**

Muito além da quantidade, a qualidade da alimentação está associada ao desenvolvimento de doenças, bem como sua prevenção. Associada ao sedentarismo, uma alimentação não saudável é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (WHO, 2022).

Tem se observado um aumento no consumo de alimentos ultraprocessados, segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) de 2017/2018, o consumo de alimentos in natura, como frutas, verduras e legumes diminuiu enquanto o consumo de alimentos ultraprocessados, como macarrão instantâneo, biscoito recheado, embutidos e refrigerantes aumentou, principalmente entre adolescentes (IBGE, 2021).

Vários estudos têm relacionado o consumo elevado de alimentos ultraprocessados com obesidade, síndrome metabólica, disbiose, hipertensão e câncer (FIOLET et al., 2018; JUUL; HEMMINGSSON, 2015; LOUZADA et al., 2015; SCHNABEL et al., 2018). Um estudo de coorte prospectivo francês associou a ingestão de alimentos



ultraprocessados com o aumento de aproximadamente 10% de doenças cardiovasculares, coronarianas e cerebrovasculares (SROUR et al., 2019).

No Brasil, um estudo encontrou entre a população infantil um consumo de alimentos ultraprocessados correspondente a 30% da ingestão calórica diária, e verificou que as crianças que mais consumiam esses alimentos tinham o índice de massa corporal significativamente maior quando comparadas às que consumiam menos. Assim como maior chance de desenvolverem obesidade e sobrepeso na fase adulta (LOUZADA et al., 2015). Em contrapartida, sabe-se que uma dieta rica em frutas e legumes está relacionada com um menor risco de desenvolvimento de doenças (MORZE et al., 2020).

Diretrizes nutricionais em todo o mundo recomendam o consumo diário desses alimentos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta o consumo mínimo de 400 g por dia de frutas, verduras e legumes (excluindo batatas e outros tubérculos) (WHO, 2020). No Brasil, o Guia Alimentar para a População Brasileira, de 2014, incentiva a ingestão de frutas e alimentos in natura, ressaltando a importância desses alimentos para a saúde (BRASIL, 2014).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) traz como recomendação uma alimentação rica em alimentos de origem vegetal como estratégia não somente de prevenção do aparecimento e desenvolvimento de câncer, como também reduzir os riscos de retorno da doença (INCA, 2021).

Essas recomendações e consensos estão pautados no conhecimento da composição desses grupos de alimentos, que além dos macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios), possuem diversos compostos bioativos capazes de prevenir várias

doenças como as vitaminas, minerais, compostos fenólicos, entre outros (AHMAD et al., 2016; LENQUISTE et al., 2015; PLAZA et al., 2016).

Os compostos fenólicos estão distribuídos na natureza de forma universal e são considerados uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas (SWALLAH et al., 2020; YANG et al., 2020), podendo ser encontrados em todas as partes das plantas, como casca, semente, caule, folhas etc (TEPLOVA et al., 2018). Esses compostos possuem diversas atividades biológicas já relatadas na literatura, como atividade antioxidante (ZAIDUN; THENT; LATIFF, 2018), protetor cardiovascular (MATTERA et al., 2017), anti-inflamatório (YAHFOUFI et al., 2018), antiviral (LECHER et al., 2019), antimicrobiano (LIMA et al., 2019), quimiopreventivo de câncer (XIAO et al., 2016), protetor renal (AVILA-CARRASCO et al., 2021; BAO; PENG, 2016; DEN HARTOGH; TSIANI, 2019), entre outros.

## 2.2. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species) são naturalmente produzidas pelo metabolismo humano durante processos celulares básicos, como na produção de trifosfato de adenosina (ATP) na cadeia de elétrons (MIRANDA-VIZUETE; VEAL, 2017), e possuem importantes papéis na imunidade, diferenciação celular e apoptose, por exemplo (NAVARRO-YEPES et al., 2014). Em condições fisiológicas, essa produção de ROS é compensada por mecanismos antioxidantes que regulam e previnem os danos celulares que as ROS podem causar. Esse sistema de defesa é composto por enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (DEPONTE, 2013).

Além da produção fisiológica de ROS, existem fatores externos que contribuem para o aumento de ROS, como o sedentarismo, poluição, alimentação, disbiose, entre

outros (figura 1) (PIZZINO et al., 2017; TAN et al., 2018). Com isso, o sistema intrínseco de defesa celular se torna insuficiente para neutralizar todos os ROS produzidos ocasionando um desequilíbrio chamado de estresse oxidativo, que tem sido associado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, doenças inflamatórias e degenerativas (figura 2) (TAN et al., 2018).

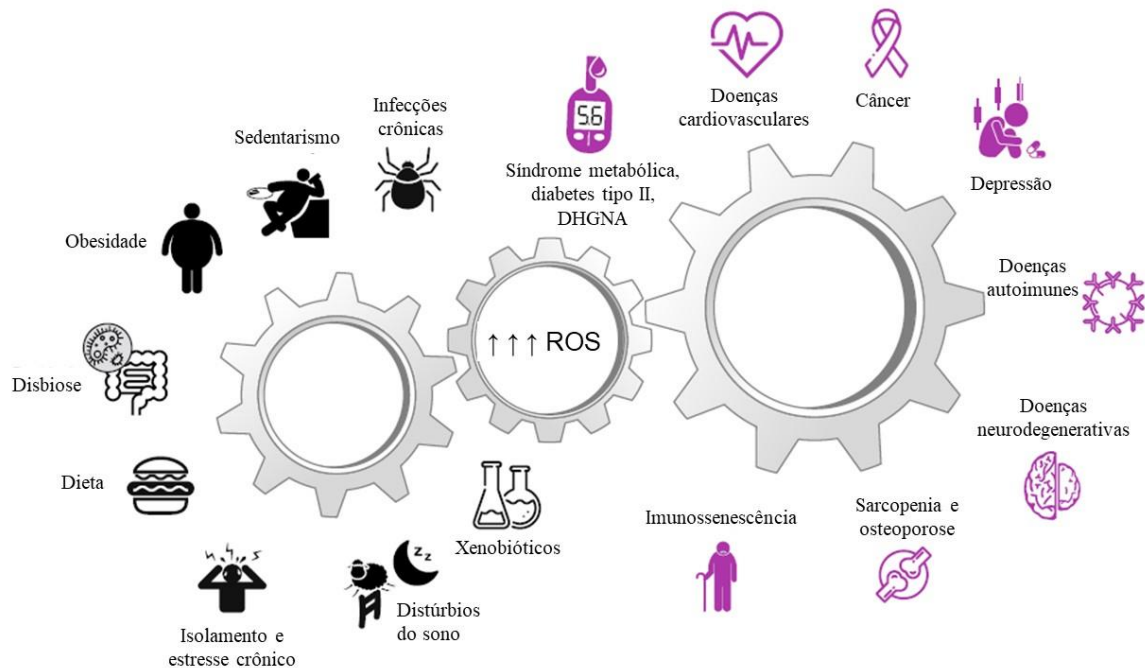


Figura 1. Causas e consequências do estresse oxidativo. Dentre as causas pode se citar infecções crônicas, sedentarismo, obesidade, disbiose intestinal, alimentação, isolamento social, estresse, má qualidade do sono e exposição a xenobióticos (poluição, agentes químicos). Todos esses fatores aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ocasionar ao desenvolvimento de doenças como síndrome metabólica, diabetes tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), doenças cardiovasculares, câncer, depressão, doenças autoimunes e neurodegenerativas, entre outras (FURMAN et al., 2019).

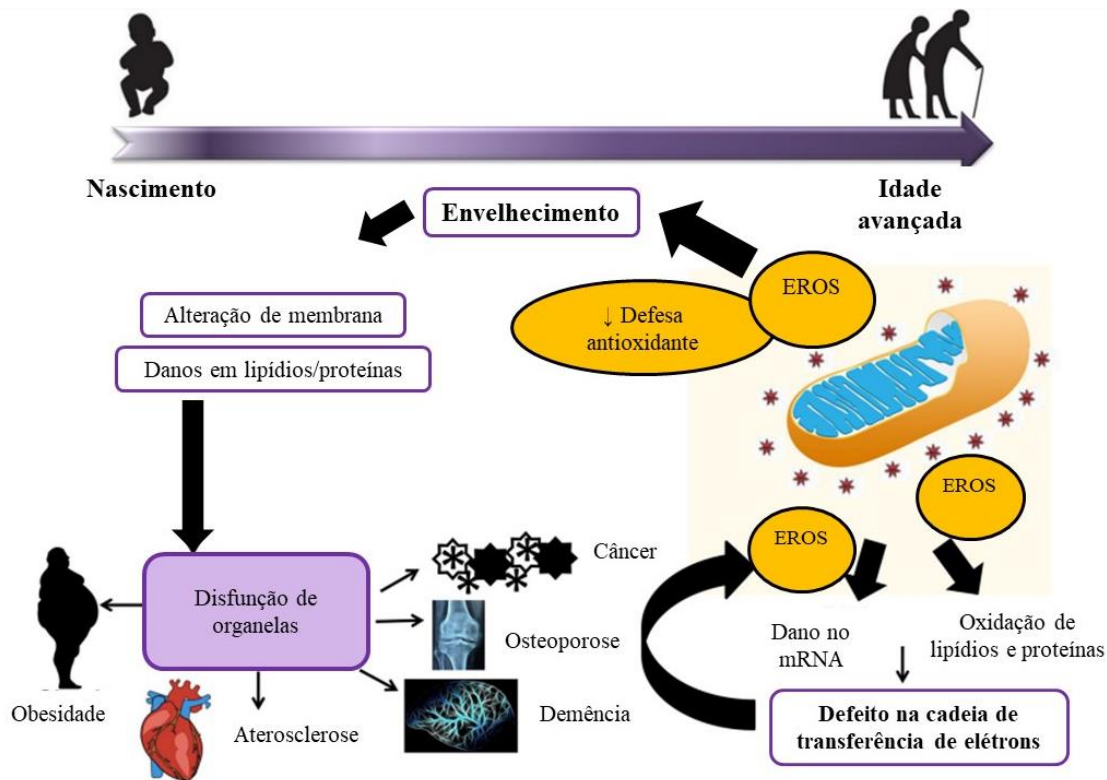


Figura 2. Interação entre o envelhecimento e o estresse oxidativo e o papel mútuo no desenvolvimento de doenças relacionadas à idade. O envelhecimento leva a um declínio das defesas antioxidantes, que ocasiona um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por consequência, leva a danos no mRNA e oxidação de lipídios/proteínas. Posteriormente, uma diminuição na função mitocondrial produz mais estresse oxidativo. Todas essas alterações podem contribuir para o desenvolvimento e agravamento de doenças relacionadas à idade Adaptado (TAN et al., 2018).

Da mesma forma que fatores externos podem influenciar na produção de ROS, é possível aumentar a oferta de antioxidantes através de fontes exógenas, como da alimentação (RICORDI; GARCIA-CONTRERAS; FARNETTI, 2015). As frutas são exemplos de alimentos que possuem compostos bioativos capazes de exercer função antioxidante e reequilibrar a balança, prevenir danos celulares causados pelas ROS e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento das doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BALISTEIRO et al., 2017; INFANTE et al., 2016; ZHU; DU; XU, 2018).

### 2.3. Nefropatia induzida por contraste

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma lesão renal grave iatrogênica, ou seja, é causada por um tratamento médico, neste caso, ocorre após a administração de contraste iodado em exames de imagem (MAMOULAKIS et al., 2017; TSAROUHAS et al., 2018). A NIC tem por definição a diminuição da função renal entre 48-72 h após administração de meios de contraste e é caracterizada pelo aumento de 0,5 mg/dL no valor da creatinina sérica (VAN DER MOLEN et al., 2018).

Dentre as lesões renais agudas iatrogênicas, a NIC é uma das causas mais comuns, com uma incidência de até 24%, dependendo dos fatores de risco do paciente, como obesidade, diabetes e doença renal crônica, por exemplo (CRUZ et al., 2012; PATTHARANITIMA; TASANARONG, 2014). Como consequência da NIC, há um aumento no tempo de internação hospitalar, da mortalidade a curto e a longo prazo, gerando maior gasto de recursos de cuidados de saúde (KUSIRISIN; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2020; SHAMS; MAYROVITZ, 2021).

A fisiopatologia da NIC é muito complexa e ainda não totalmente elucidada. Como está esquematizada na figura 3, são diversos mecanismos que induzem essa lesão, como por exemplo, vasoconstrição renal, que leva a isquemia renal, principalmente na medula (ACR, 2021; ANDREUCCI et al., 2014; SCODITTI; MASSARO; MONTINARI, 2013), efeitos citotóxicos diretos dos meios de contraste, causando danos às células tubulares, ativação de mediadores inflamatórios (CAIAZZA et al., 2014; GUSS et al., 2017), e estresse oxidativo causado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) (KUSIRISIN; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2020).

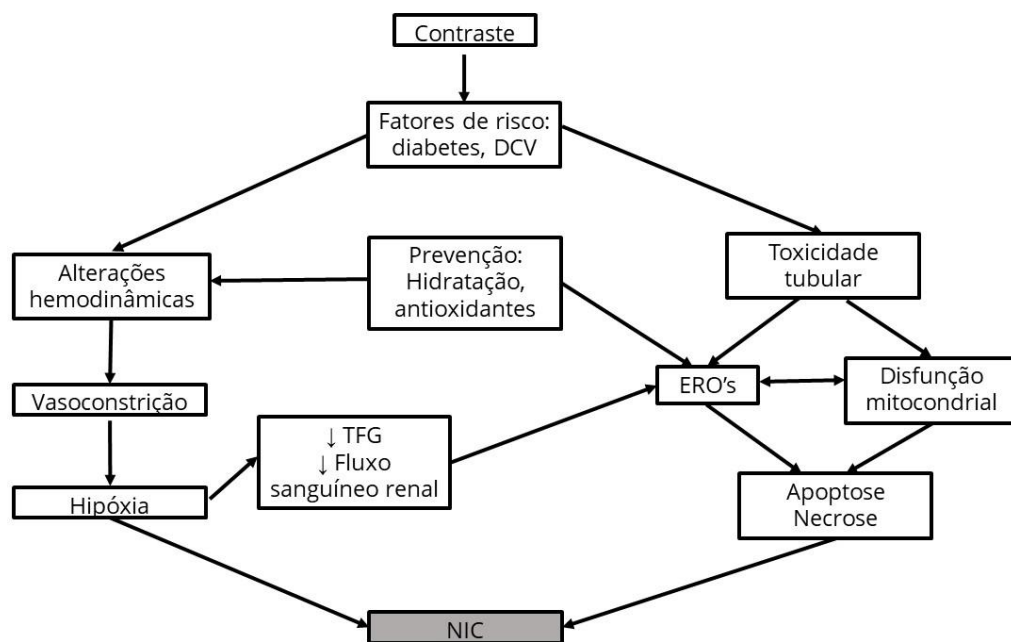


Figura 3. Fisiopatologia da Nefropatia Induzida por Contraste (NIC). DCV: Doenças cardiovasculares; TFG: Taxa de filtração glomerular; ROS: Espécies reativas de oxigênio. (Adaptado: MAMOULAKIS et al., 2017).

Na maior parte da população a NIC é reversível, porém existem alguns fatores de risco que podem aumentar sua incidência e suas consequências, como por exemplo a idade avançada (> 65 anos) tem sido associada a um maior risco de NIC (NICOLA et al., 2015), a quantidade, o tipo e as características do contraste (principalmente osmolalidade e viscosidade), desidratação ou presença de comorbidades como diabetes mellitus, doença cardiovascular, hipertensão, insuficiência renal grave pré-existente (ACR, 2021; AZZALINI; SPAGNOLI; LY, 2016; DAVENPORT et al., 2013; KATSIKI et al., 2015).

Porém, considerando que a maior parte dos procedimentos que utilizam meios de contraste são realizados de maneira não emergente, há tempo hábil para identificar pacientes de risco e estabelecer condutas preventivas (HOSSAIN et al., 2018), como por exemplo, o uso da dose mínima necessária de contraste, assim como a escolha

do meio de contraste, hidratação do paciente e o uso da n-acetilcisteína (NAC) (SHAMS; MAYROVITZ, 2021; XU et al., 2016).

A NAC é um medicamento derivado acetilado do aminoácido cisteína, tem sido utilizado como um agente protetor dos rins, pois possui propriedades antioxidantes e vasodilatadoras promissoras, além de prevenir a apoptose celular. Outra atividade biológica da NAC é o seu efeito vasodilatador, relacionada à produção de óxido nítrico (BRIGUORI et al., 2011; HOSSEINJANI; MOGHADDAS; KHALILI, 2013). Porém as evidências de seu real efeito protetor ainda não são conclusivas (HOSSAIN et al., 2018; SUBRAMANIAM et al., 2016; XU et al., 2016).

Nesse contexto, a investigação de intervenções preventivas eficazes contra NIC é fundamental para evitar danos renais, custos e ônus associados a essa complicação, como por exemplo, as plantas medicinais com potencial biológico podem se tornar uma alternativa eficiente ao uso de medicamentos (BÔA et al., 2015; MAMOULAKIS et al., 2017; SCHARNWEBER; ALHILALI; FAKHRAN, 2017).

### 2.3.1. Modelo murino de nefropatia induzida por contraste

O primeiro caso clínico registrado de nefropatia induzida por contraste foi relatado em 1941 (PENDERGRASS, 1942), mas somente em 1980 foi publicado o primeiro modelo experimental de nefropatia por contraste utilizando coelhos e ratos como modelos experimentais (GOLMAN; HOLTÅS, 1980).

Depois disso, outros estudos foram publicados ao longo do tempo utilizando diferentes tipos de contrastes e modelos animais, e em 2015, o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional da Universidade Vila Velha desenvolveu um modelo simples e reprodutível de nefropatia utilizando camundongos (BÔA et al., 2015).

Os modelos anteriores utilizavam a via intravascular para administração dos medicamentos e contraste, uma via de difícil acesso devido ao tamanho do animal (AGMON et al., 1994; BILLINGS et al., 2008). Por outro lado, no estudo de BÔA et al., (2015) foi padronizado a via intraperitoneal que tornou mais fácil o manejo e reprodução do modelo. Além disso, o uso de inibidores da produção de prostaglandinas (indometacina) e óxido nítrico (L-NAME) foi mantido assim como nos outros estudos prévios, com o objetivo de mimetizar o metabolismo de um paciente com comorbidades vasculares e renais, considerando que somente a administração do contraste não causa nefropatia nos animais, como também não causa lesão renal em pacientes saudáveis (BILLINGS et al., 2008; KISS; HAMAR, 2016; MAMOULAKIS et al., 2017).

#### 2.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis são uma classe metabólitos secundários biossintetizados a partir das vias de pentose fosfato, chiquimato e fenilpropanóide (FARIAS et al., 2020). Esses compostos são responsáveis pela proteção das plantas atuando como moléculas sinalizadoras em defesa contra o estresse oxidativo e a radiação ultravioleta, além de atrair polinizadores e animais para dispersar sementes (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2019). Por isso a composição e variedade de compostos podem variar de acordo com a espécie e até mesmo dentro da própria espécie dependendo da localização, clima, solo, temperatura, estação do ano, índices de chuva (LEMOS et al., 2015, 2016).

Os polifenóis possuem estruturas químicas características com um ou mais anéis aromáticos e com dois ou mais grupos hidroxila (figuras 4 e 5). Eles podem ser encontrados nas frutas e hortaliças nas suas formas livres ou conjugados com



açúcares, ácidos, entre outras (SKROVANKOVA et al., 2015). Podem ser divididos em várias classes (por exemplo, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e stilbenos) (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2019).

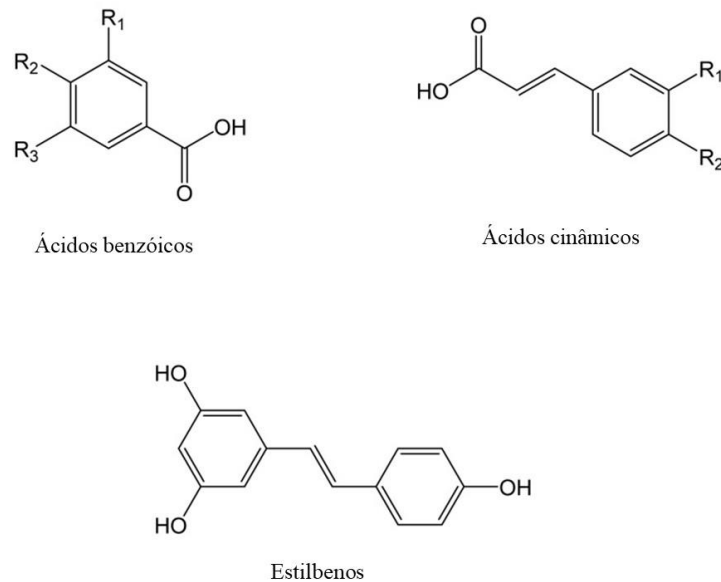


Figura 4. Estruturas básicas dos compostos não-flavonoides

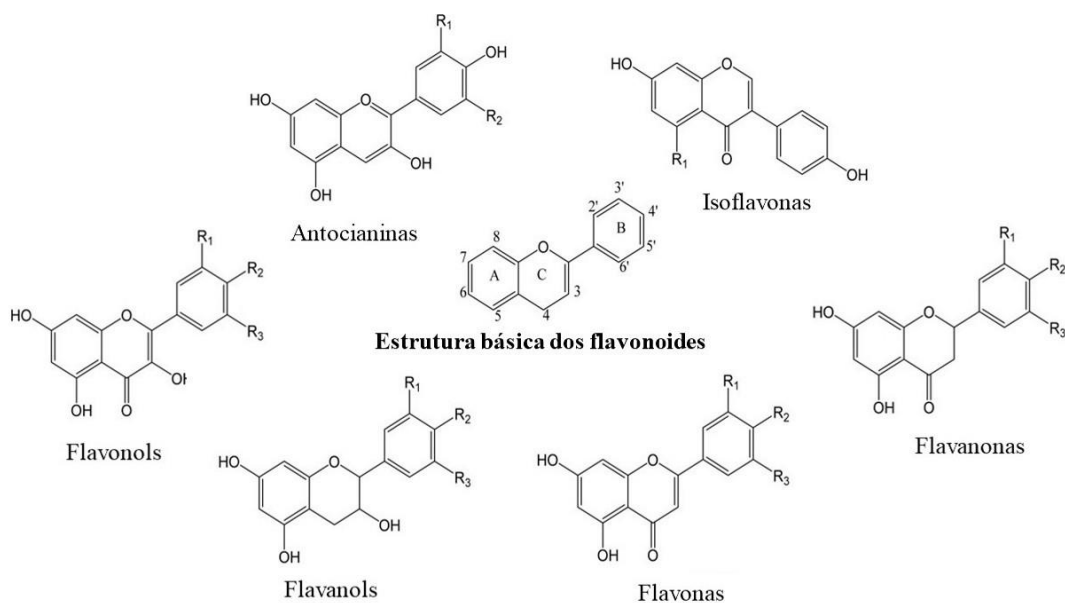


Figura 5. Estruturas básicas dos compostos flavonoides

Dentre os compostos com atividade antioxidante presente nas frutas e vegetais, os compostos fenólicos são mais comuns (MINATEL et al., 2017) e são atribuídos a características desses alimentos como cor, textura, adstringência, sabor, mas além disso também estão associados a benefícios a saúde humana, como na melhora da microbiota e prevenção de doenças crônicas como as doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças neurológicas (BLAHOVA et al., 2021; HÜGEL et al., 2016; MAKAREWICZ et al., 2021; SHAHIDI; YEO, 2018; TULI et al., 2019; UDDIN; KABIR, 2019; UDDIN et al., 2020).

Os efeitos biológicos já descritos dos polifenóis são associados, principalmente, à capacidade de reduzir o estresse oxidativo, através de mecanismos como o sequestro ou inibição de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, transferência de elétrons, assim como ativação de enzimas antioxidantes (ADDEPALLI; SURYAVANSHI, 2018; AGUNLOYE et al., 2019; ALI et al., 2019; CHEN et al., 2018; FAN et al., 2018; FARIAS et al., 2020; FEI et al., 2019).

## 2.5. Frutas da Mata Atlântica

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade em todo o mundo, cuja fauna e flora foram investigadas devido à sua complexidade de substâncias químicas utilizadas para benefícios humanos (PONTES et al., 2016). A Mata Atlântica é considerada um hotspot, ou seja, uma área de diversidade ecológica com risco de extinção. Originalmente, a área de vegetação cobria cerca de 17 Estados desde o Nordeste até o Sul, com diferentes climas e relevos. Porém, estima-se que restam 12% de remanescentes florestais, incluindo áreas de reflorestamento, sendo o bioma mais ameaçado do planeta, por isso foi decretada Reserva da Biosfera pela Unesco e Patrimônio Nacional, na Constituição Federal de 1988 (RIBEIRO et al., 2011).

Portanto, a preservação e valorização das espécies vegetais e animais desse bioma é de grande importância, pois a grande quantidade de espécies nativas e exóticas subexploradas, podem ser uma possível fonte de renda futura para a população local, e uma oportunidade de acesso a mercados especiais onde os consumidores têm interesse na em alimentos com potencial capacidade de prevenção de doenças (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014; HAMINIUK et al., 2011).

Pesquisadores de várias partes do mundo, têm investigado espécies de vegetais que ainda não foram estudadas, para avaliar seu conteúdo de compostos bioativos, assim como o seu possível potencial contra doenças crônicas, a fim de diversificar a dieta humana, para aplicação terapêutica e melhoria e valorização da economia local (BOUHLALI et al., 2017).

Na busca de novas fontes de moléculas bioativas, as espécies de frutas nativas brasileiras despertam atenção devido ao seu potencial altamente valioso, ainda não explorado, agroindustrial, alimentar e terapêutico (VIDAL et al., 2012).

#### 2.5.1. Gênero *Eugenia*

Um importante membro da família Myrtaceae é a *Eugenia*, que é um dos maiores gêneros dessa família com cerca de quinhentas espécies (MABBERLEY, 2017). Várias espécies desse gênero já foram relatadas para uso na medicina popular (GUIMARÃES et al., 2009).

Espécies de frutas do gênero *Eugenia* têm um vasto potencial econômico e farmacológico, além de ampla exploração comercial de suas frutas comestíveis, madeira, óleos essenciais e uso como plantas ornamentais. No Brasil, existem cerca de 400 espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* distribuídas em todo o país,

incluindo espécies nativas da Mata Atlântica, como a grumixama (*Eugenia brasiliensis*), goiabão ou araçá-piranga (*Eugenia leitonii*), cereja-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* DC.), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) entre outras (DAMETTO et al., 2017) (FRANZON; RASEIRA, 2006) (GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010) (INFANTE et al., 2016) (TEIXEIRA et al., 2015).

Estudo prévio relata que a Pitanga (*Eugenia uniflora*) é rica em compostos bioativos, como carotenoides e antocianinas, e possui altos níveis de vitaminas A e C, superiores à de outras frutas e vegetais comumente consumidos, como o mamão, tomate e brócolis, por exemplo (SCHMIDT et al., 2019).

Estudos identificaram ácido elágico, kaempferol e quercetina presentes na *Eugenia dysenterica* DC e demonstraram atividades biológicas em ensaios in vivo. O tratamento com o extrato dessa fruta rico em polifenóis reduziu ganho de peso corporal e adiposidade, melhorou os parâmetros bioquímicos como os triglicerídeos e colesterol LDL plasmático em camundongos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura e sacarose. Além da prevenção da obesidade, esse extrato também melhorou a homeostase da glicose e atenuou a dislipidemia em camundongos já obesos (DONADO-PESTANA; BELCHIOR; GENOVESE, 2015; DONADO-PESTANA et al., 2018; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010).

INFANTE et al., (2016) encontraram epicatequina e ácido gálico nas folhas, sementes e polpa de quatro espécies do gênero *Eugenia*: *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia involucrata* DC, *Eugenia myrcianthes* Nied e *Eugenia leitonii* D. Legrand. Além disso, os extratos etanólicos das diferentes amostras apresentaram atividade antioxidante em métodos *in vitro* e atividade anti-inflamatória *in vivo*, reduzindo a migração de

neutrófilos em modelo de inflamação de fase aguda induzida por carragenina em camundongos.

TEIXEIRA et al., (2015) demonstraram que a *Eugenia brasiliensis* Lam. é uma fruta rica em antocianinas e flavonóis, como a cianidina-3-glicosídeo, quercetina e elagitaninos, apresentando assim um potencial como alimento funcional.

Uma fruta desse gênero ainda pouco explorada é a *Eugenia candolleana*, também conhecida como cambuí-roxo, cereja preta ou ameixa da Mata Atlântica, uma espécie endêmica no Brasil, nativa da Mata Atlântica, ocorrendo em estados do Nordeste, Sudeste e Sul (SOBRAL et al., 2015).

O óleo essencial de suas folhas já possui estudos demonstrando atividades antinocetivas, anti-inflamatórias, atribuída a sua possível capacidade de inibir a síntese de prostaglandinas (GUIMARÃES et al., 2009). Outra atividade deste óleo essencial é a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (NEVES et al., 2017).

Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa identificou compostos fenólicos, como a quercetina, epicatequina, ácido gálico e ácido clorogênico na semente e na parte comestível (polpa com casca) do cambuí-roxo. As amostras também apresentaram alta atividade antioxidante em diferentes métodos químicos e anti-inflamatória em cultura de células (SOARES et al., 2022).



Figura 6. Fruto do cambuí-roxo. Fonte: acervo pessoal.

Considerando a coloração intensa da casca (figura 6), o presente estudo separou a casca da polpa, para avaliar sua composição química e atividade biológica.

### 2.5.2. Gênero *Garcinia*

Dentre as espécies encontradas na Mata Atlântica, destaca-se a *Garcinia brasiliensis* Mart., que apesar de ser nativa da região Amazônica, é encontrada em parte da Mata Atlântica, desde o estado do Rio Grande do Sul até a Bahia. Sua árvore apresenta grande porte com folhas compridas oblongas e seus frutos têm a casca amarela. No Brasil é conhecida principalmente por bacupari, mas pode ser chamada de bacuri, porocó e bacuripari, e ainda por guapomo, na Bolívia (CORRÊA; PENA, 1984).

Estudos com frutas do gênero *Garcinia* tem demonstrado importantes atividades biológicas. MAMAT et al., (2020) verificaram que o mangostão (*Garcinia mangostana* Linn.) é rico em metabólitos como os fenólicos, terpenos, alcalóides e xantonas, compostos com propriedades bioativas.

Na *Garcinia xanthochymus* foram encontrados compostos como as xantonas, benzofenonas, flavonoides, isocumarinas e depsidonas (HASSAN; TAHER;

SUSANTI, 2018). Em um estudo que avaliou a atividade antioxidante de extratos de folhas, raízes e frutas de *Garcinia xanthochymus* através de métodos químicos, DPPH e ABTS, observou que os extratos apresentaram atividade semelhante ao padrão BHT (FU et al., 2012).

ARAÚJO et al., (2019) avaliou os efeitos da administração de extrato etanólico da casca do bacupari (*Garcinia brasiliensis*) (674 mg/kg de peso) em ratos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura. Os autores observaram que o tratamento modulou a microbiota intestinal, diminuindo ( $p < 0,05$ ) a abundância de microorganismos dos filos Firmicutes e Proteobacteria e aumentando ( $p < 0,05$ ) a concentração fecal do ácido propiônico. Além disso, o tratamento apresentou atividade antioxidante e anti-inflamatória, inibindo o NF- $\kappa$ B e aumentando a expressão da catalase ( $p < 0,05$ ).

Outros estudos, que também utilizaram a casca de bacupari, demonstraram redução da obesidade e de suas complicações, como a esteatose hepática não alcoólica, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, modulando as vias da lipólise e lipogênese hepática (MOREIRA et al., 2017, 2018).

MELO et al., (2021) avaliaram composição e atividade biológica da farinha da casca e semente do bacupari, encontrando altos teores de proteína e de fibras, além disso de uma quantidade significativa de compostos fenólicos e atividade antioxidante, classificando essas farinhas como alimento com excelentes propriedades bioativas.

Em um trabalho com as folhas de bacupari, foi observado um efeito anti-inflamatório e antinocepcivo em animais, reduzindo ( $p < 0,05$ ) a formação de edema de pata induzido por carragenina, menor ( $p < 0,05$ ) crescimento de tecido fibrovascular

induzido pela introdução subcutânea de algodão e menor ( $p < 0,05$ ) número de episódios de contorções induzidas por ácido acético (SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

As folhas também apresentam importante atividade antioxidante no ensaio *in vitro* do DPPH e antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*) com CIM (concentração inibitória mínima) abaixo de 100 µg/ml (NAVES et al., 2019).

Considerando que frutas do gênero *Garcinia* apresentam inúmeras atividades biológicas atribuídas a sua composição, e que a *Garcinia brasiliensis* Mart. também já demonstrou atividades importantes, sua inserção na alimentação da população traria benefícios, além de ser sustentável, por se tratar de uma fruta nativa brasileira. Porém, ainda não foi avaliado a atividade antioxidante em diferentes métodos *in vitro* do extrato das cascas do bacupari, assim como sua atividade nefroprotetora em modelo murino de nefropatia induzida por contraste.

## REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ACR, Committee on Drugs and Contrast Media. **ACR Manual On Contrast Media**. Disponível em: <[https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Clinical-Resources/Contrast\\_Media.pdf](https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Clinical-Resources/Contrast_Media.pdf)>. Acesso em: 2 jun. 2022.

ADDEPALLI, Veeranjanyulu; SURYAVANSHI, Sachin V. Catechin Attenuates Diabetic Autonomic Neuropathy in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedecine & Pharmacotherapie)**, v. 108, p. 1517–1523, Dec. 2018.

AGMON, Y et al. Nitric Oxide and Prostanoids Protect the Renal Outer Medulla from Radiocontrast Toxicity in the Rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1069–1075, Sep. 1994.

AGUNLOYE, Odunayo Michael et al. Cardio-Protective and Antioxidant Properties of Caffeic Acid and Chlorogenic Acid: Mechanistic Role of Angiotensin Converting Enzyme, Cholinesterase and Arginase Activities in Cyclosporine Induced Hypertensive Rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedecine & Pharmacotherapie)**, v. 109, p. 450–458, Jan. 2019.

AHMAD, Naveed et al. Characterization of Free and Conjugated Phenolic Compounds in Fruits of Selected Wild Plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80–89, 1 Jan. 2016.



- ALI, Fahad et al. Therapeutic Potential of Luteolin in Transgenic Drosophila Model of Alzheimer's Disease. **Neuroscience Letters**, v. 692, p. 90–99, 23 Jan. 2019.
- ANDREUCCI, Michele et al. Acute Kidney Injury by Radiographic Contrast Media: Pathogenesis and Prevention. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 362725, 14 Aug. 2014.
- ANUNCIAÇÃO, Pamella Cristine et al. Identification and Quantification of the Native Carotenoid Composition in Fruits from the Brazilian Amazon by HPLC–DAD–APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, p. 103296, Oct. 2019.
- ARAÚJO, Fernanda de Oliveira et al. Bacupari (*Garcinia brasiliensis*) Extract Modulates Intestinal Microbiota and Reduces Oxidative Stress and Inflammation in Obese Rats. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 122, p. 199–208, Aug. 2019.
- AVILA-CARRASCO, Lorena et al. Potential Therapeutic Effects of Natural Plant Compounds in Kidney Disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 20, 9 Oct. 2021.
- AZZALINI, Lorenzo; SPAGNOLI, Vincent; LY, Hung Q. Contrast-Induced Nephropathy: From Pathophysiology to Preventive Strategies. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 2, p. 247–255, Feb. 2016.
- BALISTEIRO, Diully Mata et al. Effect of Clarified Brazilian Native Fruit Juices on Postprandial Glycemia in Healthy Subjects. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 100, n. Pt 2, p. 196–203, Oct. 2017.
- BAO, Hui; PENG, Ai. The Green Tea Polyphenol(-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Its Beneficial Roles in Chronic Kidney Disease. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 99–103, 1 Sep. 2016.
- BILLINGS, F T et al. Alpha2-Adrenergic Agonists Protect against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 295, n. 3, p. F741-8, Sep. 2008.
- BLAHOVA, Jana et al. Pharmaceutical Drugs and Natural Therapeutic Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 8, 17 Aug. 2021.
- BÔA, Igor Santos Fonte et al. Resin from *Virola Oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0144329, 16 Dec. 2015.
- BORGES, Leonardo Luiz; CONCEIÇÃO, Edemilson Cardoso; SILVEIRA, Dâmaris. Active Compounds and Medicinal Properties of Myrciaria Genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 15 Jun. 2014.
- BOUHLALI, Eimad dine Tariq et al. Functional Composition and Antioxidant Activities of Eight Moroccan Date Fruit Varieties ( *Phoenix Dactylifera* L.). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 3, p. 257–264, Jul. 2017.
- BRASIL. **Guia Alimentar Para a População Brasileira Guia Alimentar Para a População Brasileira**. [S.l: s.n.], 2014. v. 2. p. 6–17
- BRIGUORI, Carlo et al. Nephrotoxicity of Contrast Media and Protective Effects of Acetylcysteine. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 3, p. 165–173, Mar. 2011.
- CAIAZZA, Antonella et al. Hemodynamic and Tubular Changes Induced by Contrast Media. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 578974, 11 Feb. 2014.
- CHEN, Xing et al. Enhancement of the Solubility, Stability and Bioaccessibility of Quercetin Using Protein-Based Excipient Emulsions. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v.

114, p. 30–37, Dec. 2018.

CORRÊA, M Pio; PENA, Leonam de Azeredo. **Dicionário Das Plantas Úteis Do Brasil e Das Exóticas Cultivadas**. [S.l.]: Rio de Janeiro : Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Floresta, 1984. p. 4324

CRUZ, Dinna N et al. Renal Replacement Therapies for Prevention of Radiocontrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. 66-78.e3, Jan. 2012.

DAMETTO, Alessandra C. et al. Chemical Composition and in Vitro Chemoprevention Assessment of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) Fruits and Leaves. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 490–502, Sep. 2017.

DAVENPORT, Matthew S et al. Contrast Material-Induced Nephrotoxicity and Intravenous Low-Osmolality Iodinated Contrast Material. **Radiology**, v. 267, n. 1, p. 94–105, Apr. 2013.

DE LIRA JÚNIOR, José Severino et al. **A Pitangueira**. [S.l: s.n.], 2007.

DEN HARTOGH, Danja J; TSIANI, Evangelia. Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 17 Jul. 2019.

DEPONTE, Marcel. Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, May 2013.

DONADO-PESTANA, Carlos M.; BELCHIOR, Thiago; GENOVESE, Maria Inés. Phenolic Compounds from Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) Fruit Prevent Body Weight and Fat Mass Gain Induced by a High-Fat, High-Sucrose Diet. **Food Research International**, v. 77, p. 177–185, Nov. 2015.

DONADO-PESTANA, Carlos M et al. Cagaita Fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and Obesity: Role of Polyphenols on Already Established Obesity. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 103, p. 40–47, Jan. 2018.

DOS SANTOS, João Flávio Costa et al. Wildfires as a Major Challenge for Natural Regeneration in Atlantic Forest. **The Science of the Total Environment**, v. 650, n. Pt 1, p. 809–821, 10 Feb. 2019.

DURAZZO, Alessandra et al. Polyphenols: A Concise Overview on the Chemistry, Occurrence, and Human Health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221–2243, Sep. 2019.

ELAZZOZI, Hanane et al. Total Phenolic and Flavonoid Contents of Anacyclus Pyrethrum Link Plant Extracts and Their Antioxidant Activity. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 5, n. 4, 6 Dec. 2019.

FAN, Shuli et al. Myricetin Ameliorates Glucocorticoid-Induced Osteoporosis through the ERK Signaling Pathway. **Life Sciences**, v. 207, p. 205–211, 15 Aug. 2018.

FARIAS, David de Paulo et al. A Critical Review of Some Fruit Trees from the Myrtaceae Family as Promising Sources for Food Applications with Functional Claims. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125630, 15 Feb. 2020.

FEI, Junliang et al. Luteolin Inhibits IL-1 $\beta$ -Induced Inflammation in Rat Chondrocytes and Attenuates Osteoarthritis Progression in a Rat Model. **Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedecine & Pharmacotherapie)**, v. 109, p. 1586–1592, Jan. 2019.

FIDELIS, Marina et al. Fruit Seeds as Sources of Bioactive Compounds: Sustainable Production of High Value-Added Ingredients from By-Products within Circular Economy. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 21, 25 Oct. 2019.

- FIOLET, Thibault et al. Consumption of Ultra-Processed Foods and Cancer Risk: Results from NutriNet-Santé Prospective Cohort. **BMJ (Clinical Research Ed.)**, v. 360, p. k322, 14 Feb. 2018.
- FRANZON, Rodrigo Cezar; RASEIRA, Maria do Carmo Bassols. Germinação in Vitro e Armazenamento Do Pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 18–20, Apr. 2006.
- FU, Meng et al. Antioxidant Activity of *Garcinia Xanthochymus* Leaf, Root and Fruit Extracts *in Vitro*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129–134, 3 Sep. 2012.
- GANESAN, Kumar; XU, Baojun. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 4 May 2017.
- GARCÍA-PÉREZ, Martha Estrella; KASANGANA, Pierre Betu; STEVANOVIC, Tatjana. Bioactive Polyphenols for Diabetes and Inflammation in Psoriasis Disease. *Studies in Natural Products Chemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2017. v. 52. p. 231–268.
- GOLMAN, K; HOLTÅS, S. Proteinuria Produced by Urographic Contrast Media. **Investigative Radiology**, v. 15, 1980.
- GONÇALVES, Any Elisa De Souza Schmidt; LAJOLO, Franco Maria; GENOVESE, Maria Inés. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 28 Apr. 2010.
- GONTIJO, Vanessa Silva et al. Isolation and Evaluation of the Antioxidant Activity of Phenolic Constituents of the *Garcinia brasiliensis* Epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230–1235, 1 Jun. 2012.
- GRANATO, Daniel et al. Effects of Geographical Origin, Varietal and Farming System on the Chemical Composition and Functional Properties of Purple Grape Juices: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 31–48, Jun. 2016.
- GUIMARÃES, Adriana G. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Essential Oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on Mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 883–887, Dec. 2009.
- GUSS, Ketheley L et al. Ultrasound-Assisted Extraction of Achyrocline Satureioides Prevents Contrast-Induced Nephropathy in Mice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 368–374, Jul. 2017.
- HAMINIUK, Charles Windson Isidoro et al. Chemical, Antioxidant and Antibacterial Study of Brazilian Fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, Jul. 2011.
- HASSAN, Nurul Khairina Najwa Che; TAHER, Muhammad; SUSANTI, Deny. Phytochemical Constituents and Pharmacological Properties of *Garcinia xanthochymus*- a Review. **Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedecine & Pharmacotherapie)**, v. 106, p. 1378–1389, Oct. 2018.
- HOSSAIN, Mohammad A et al. Contrast-Induced Nephropathy: Pathophysiology, Risk Factors, and Prevention. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 29, n. 1, p. 1–9, Feb. 2018.
- HOSSEINJANI, Hesamoddin; MOGHADDAS, Azadeh; KHALILI, Hossein. N-Acetylcysteine for the Prevention of Non-Contrast Media Agent-Induced Kidney Injury: From Preclinical Data to Clinical Evidence. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 1375–1390,

Jul. 2013.

HÜGEL, Helmut M et al. Polyphenol Protection and Treatment of Hypertension. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 220–231, 15 Feb. 2016.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares : 2017-2018 : Perfil Das Despesas No Brasil : Indicadores de Qualidade de Vida / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2021. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101742.pdf>>. Acesso em: 1 feb. 2022.

INCA. **Alimentação | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/alimentacao>>. Acesso em: 6 feb. 2022.

INFANTE, Juliana et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. e0152974, 6 Apr. 2016.

JUUL, Filippa; HEMMINGSSON, Erik. Trends in Consumption of Ultra-Processed Foods and Obesity in Sweden between 1960 and 2010. **Public Health Nutrition**, v. 18, n. 17, p. 3096–3107, Dec. 2015.

KASOTE, Deepak M et al. Significance of Antioxidant Potential of Plants and Its Relevance to Therapeutic Applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982–991, 11 Jun. 2015.

KATSIKI, Niki et al. Contrast-Induced Nephropathy: An “All or None” Phenomenon? **Angiology**, v. 66, n. 6, p. 508–513, Jul. 2015.

KISS, Norbert; HAMAR, Péter. Histopathological Evaluation of Contrast-Induced Acute Kidney Injury Rodent Models. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 3763250, 16 Nov. 2016.

KUSIRISIN, Prit; CHATTIPAKORN, Siriporn C; CHATTIPAKORN, Nipon. Contrast-Induced Nephropathy and Oxidative Stress: Mechanistic Insights for Better Interventional Approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 400, 20 Oct. 2020.

LECHER, Julia C et al. Genistein Has Antiviral Activity against Herpes B Virus and Acts Synergistically with Antiviral Treatments to Reduce Effective Dose. **Viruses**, v. 11, n. 6, 31 May 2019.

LEMONS, Mayara Fumiere et al. Seasonal Variation Affects the Composition and Antibacterial and Antioxidant Activities of Thymus Vulgaris. **Industrial Crops and Products**, 2016.

\_\_\_\_\_. Seasonality Modifies Rosemary’s Composition and Biological Activity. **Industrial Crops and Products**, v. 70, n. 70, p. 41–47, Aug. 2015.

LENQUISTE, Sabrina Alves et al. Jaboticaba Peel and Jaboticaba Peel Aqueous Extract Shows in Vitro and in Vivo Antioxidant Properties in Obesity Model. **Food Research International**, v. 77, p. 162–170, Nov. 2015.

LIMA, M C et al. A Review of the Current Evidence of Fruit Phenolic Compounds as Potential Antimicrobials against Pathogenic Bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 259–270, May 2019.

LOUZADA, Maria Laura da Costa et al. Consumption of Ultra-Processed Foods and Obesity in Brazilian Adolescents and Adults. **Preventive Medicine**, v. 81, p. 9–15, Dec. 2015.

MABBERLEY, David J. **Mabberley’s Plant-Book: A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses**. 4th. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2017.

MAKAREWICZ, Małgorzata et al. The Interactions between Polyphenols and Microorganisms,

Especialy Gut Microbiota. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 2, 28 Jan. 2021.

MAMAT, Siti Farah et al. GC-MS and LC-MS Analyses Reveal the Distribution of Primary and Secondary Metabolites in Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) Fruit during Ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 262, p. 109004, Feb. 2020.

MAMOULAKIS, Charalampos et al. Contrast-Induced Nephropathy: Basic Concepts, Pathophysiological Implications and Prevention Strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 180, p. 99–112, Dec. 2017.

MARTINOTTO, Cristiano et al. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Boletim Técnico Universidade Federal De Lavras**, v. 1, n. 78, p. 1–21, 2008.

MATTERA, Rosanna et al. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 20 May 2017.

MELO, Anely Maciel de et al. *Garcinia brasiliensis* Fruits and Its By-Products: Antioxidant Activity, Health Effects and Future Food Industry Trends – A Bibliometric Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 325–335, Jun. 2021.

METSÄMUURONEN, Sari; SIRÉN, Heli. Bioactive Phenolic Compounds, Metabolism and Properties: A Review on Valuable Chemical Compounds in Scots Pine and Norway Spruce. **Phytochemistry Reviews : Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 18, n. 3, p. 623–664, Jun. 2019.

MINATEL, Igor Otavio et al. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In: SOTO-HERNANDEZ, Marcos; PALMA-TENANGO, Mariana; GARCIA-MATEOS, Maria del Rosario (Eds.). . **Phenolic Compounds - Biological Activity**. [S.l.]: InTech, 2017. .

MIRANDA-VIZUETE, Antonio; VEAL, Elizabeth A. Caenorhabditis Elegans as a Model for Understanding ROS Function in Physiology and Disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 708–714, Apr. 2017.

MOREIRA, Maria Eliza de Castro et al. Bacupari Peel Extracts (*Garcinia brasiliensis*) Reduces the Biometry, Lipogenesis and Hepatic Steatosis in Obese Rats. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 114, p. 169–177, Dec. 2018.

\_\_\_\_\_. Bacupari Peel Extracts (*Garcinia brasiliensis*) Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143–153, Feb. 2017.

MORZE, Jakub et al. Diet Quality as Assessed by the Healthy Eating Index, Alternate Healthy Eating Index, Dietary Approaches to Stop Hypertension Score, and Health Outcomes: A Second Update of a Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 120, n. 12, p. 1998- 2031.e15, Dec. 2020.

NAVARRO-YEPES, Juliana et al. Antioxidant Gene Therapy against Neuronal Cell Death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 2, p. 206–230, May 2014.

NAVES, V M L et al. Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Garcinia brasiliensis* Extracts. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 244–250, Aug. 2019.

NEVES, Ilzenayde de Araújo et al. Composição e Atividade Larvicida Do Óleo Essencial *Eugenia candolleana* DC. (MYRTACEAE) Contra o *Aedes Aegypti*. **Revista Virtual de Química**, 2017.

NICOLA, Refky et al. Contrast-Induced Nephropathy: Identifying the Risks, Choosing the Right Agent, and Reviewing Effective Prevention and Management Methods. **Current Problems in Diagnostic Radiology**, v. 44, n. 6, p. 501–504, Dec. 2015.

PATTHARANITIMA, Pattharawin; TASANARONG, Adis. Pharmacological Strategies to Prevent Contrast-Induced Acute Kidney Injury. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 236930, 26 Feb. 2014.

PENDERGRASS, E P. A Survey of Death and Unfavorable Sequelae Following the Administration of Contrast Media. **American College of Radiology**, v. 48, p. 741–762, 1942Tradução G W Chamberlain. .

PIZZINO, Gabriele et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 8416763, 27 Jul. 2017.

PLAZA, Merichel et al. Characterization of Antioxidant Polyphenols from Myrciaria Jaboticaba Peel and Their Effects on Glucose Metabolism and Antioxidant Status: A Pilot Clinical Study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185–197, 15 Nov. 2016.

PONTES, A R M et al. Mass Extinction and the Disappearance of Unknown Mammal Species: Scenario and Perspectives of a Biodiversity Hotspot's Hotspot. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. e0150887, 18 May 2016.

RECIO, M C; ANDUJAR, I; RIOS, J L. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2088–2103, 2012.

RIBEIRO, M C et al. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. . In: ZACHOS, F; HABEL, J (Eds.). . **Biodiversity Hotspots**. Heidelberg, Berlin: Springer, 2011. .

RICORDI, Camillo; GARCIA-CONTRERAS, Marta; FARNETTI, Sara. Diet and Inflammation: Possible Effects on Immunity, Chronic Diseases, and Life Span. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34 Suppl 1, p. 10–13, 2015.

SANTA-CECÍLIA, Flávia V et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 467–473, 27 Jan. 2011.

SCHARNWEBER, Travis; ALHILALI, Lea; FAKHRAN, Saeed. Contrast-Induced Acute Kidney Injury: Pathophysiology, Manifestations, Prevention, and Management. **Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 743–753, Nov. 2017.

SCHMIDT, Helena de Oliveira et al. Vitamin and Bioactive Compound Diversity of Seven Fruit Species from South Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 7, p. 3307–3317, May 2019.

SCHNABEL, Laure et al. Association Between Ultra-Processed Food Consumption and Functional Gastrointestinal Disorders: Results From the French NutriNet-Santé Cohort. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 113, n. 8, p. 1217–1228, Aug. 2018.

SCODITTI, Egeria; MASSARO, Marika; MONTINARI, Maria Rosa. Endothelial Safety of Radiological Contrast Media: Why Being Concerned. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 1–2, p. 48–53, Jan. 2013.

SHAHIDI, Fereidoon; YEO, JuDong. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 25 May 2018.

SHAMS, Elham; MAYROVITZ, Harvey N. Contrast-Induced Nephropathy: A Review of Mechanisms and Risks. **Cureus**, v. 13, n. 5, p. e14842, 4 May 2021.

SKROVANKOVA, Sona et al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 24673–24706, 16 Oct. 2015.

SOARES, Karla Lirio et al. Chemical Characterization and Anti-Inflammatory and Antioxidant

- Potential of Fruits of *Eugenia candolleana* DC. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e425111335576, 11 Oct. 2022.
- SOBRAL, M et al. Myrtaceae in Lista de Espécies Da Flora Do Brasil. **Jardim Botânico Do Rio de Janeiro**, p. Disponível em:, 2015.
- SROUR, Bernard et al. Ultra-Processed Food Intake and Risk of Cardiovascular Disease: Prospective Cohort Study (NutriNet-Santé). **BMJ (Clinical Research Ed.)**, v. 365, p. l1451, 29 May 2019.
- SUBRAMANIAM, Rathan M et al. Effectiveness of Prevention Strategies for Contrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 6, p. 406–416, 15 Mar. 2016.
- SWALLAH, Mohammed Sharif et al. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. **International Journal of Food Science**, v. 2020, p. 9081686, 7 May 2020.
- TANGNEY, Christy C.; STAFFILENO, Beth A.; RASMUSSEN, Heather E. Healthy Eating: How Do We Define It and Measure It? What's the Evidence? **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 13, n. 1, p. e7–e15, Jan. 2017.
- TAN, Bee Ling et al. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1162, 16 Oct. 2018.
- TEIXEIRA, Luciane de Lira et al. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5417–5427, 10 Jun. 2015.
- TEPLOVA, V V et al. Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 221–237, May 2018.
- TSAO, Rong. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 10 Dec. 2010.
- TSAROUHAS, Konstantinos et al. Oxidative Stress and Kidney Injury in Trans-Radial Catheterization. **Biomedical Reports**, v. 8, n. 5, p. 417–425, May 2018.
- TULI, Hardeep Singh et al. Molecular Mechanisms of Action of Genistein in Cancer: Recent Advances. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1336, 6 Dec. 2019.
- UDDIN, Md Sahab; KABIR, Md Tanvir. Emerging Signal Regulating Potential of Genistein against Alzheimer's Disease: A Promising Molecule of Interest. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 197, 20 Sep. 2019.
- UDDIN, Md Sahab et al. Exploring the Multimodal Role of Phytochemicals in the Modulation of Cellular Signaling Pathways to Combat Age-Related Neurodegeneration. **The Science of the Total Environment**, v. 725, p. 138313, 10 Jul. 2020.
- VAN DER MOLEN, Aart J et al. Post-Contrast Acute Kidney Injury - Part 1: Definition, Clinical Features, Incidence, Role of Contrast Medium and Risk Factors: Recommendations for Updated ESUR Contrast Medium Safety Committee Guidelines. **European Radiology**, v. 28, n. 7, p. 2845–2855, Jul. 2018.
- VIDAL, Andressa Meirelles et al. A Ingestão de Alimentos Funcionais e Sua Contribuição Para a Diminuição Da Incidência de Doenças. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e Da Saúde**, v. 1, p. 43–52, 2012.
- VUOLO, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva; MARÓSTICA JUNIOR, Mário Roberto. Phenolic

Compounds. **Bioactive Compounds**. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 33–50.

WHO, World Health Organization. **Healthy Diet**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/healthy-diet#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/healthy-diet#tab=tab_1)>.

\_\_\_\_\_. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>.

XIAO, Xue et al. Inhibition of Nuclear Factor-Kappa B Enhances the Tumor Growth of Ovarian Cancer Cell Line Derived from a Low-Grade Papillary Serous Carcinoma in P53-Independent Pathway. **BMC Cancer**, v. 16, p. 582, 2 Aug. 2016.

XU, Renfan et al. Effectiveness of N-Acetylcysteine for the Prevention of Contrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 9, 23 Sep. 2016.

YAHFOUFI, Nour et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2 Nov. 2018.

YANG, Yanni et al. Analysis of Leaf Morphology, Secondary Metabolites and Proteins Related to the Resistance to *Tetranychus Cinnabarinus* in Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14197, 26 Aug. 2020.

Z Aidun, Nurul Hannim; Thent, Zar Chi; Latiff, Azian Abd. Combating Oxidative Stress Disorders with Citrus Flavonoid: Naringenin. **Life Sciences**, v. 208, p. 111–122, 1 Sep. 2018.

Zhu, Fengmei; Du, Bin; Xu, Baojun. Anti-Inflammatory Effects of Phytochemicals from Fruits, Vegetables, and Food Legumes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 8, p. 1260–1270, 24 May 2018.



**CAPÍTULO 1 - Caracterização química e atividade antioxidante *in vitro* de cascas dos frutos do cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e do bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart).**

**1. OBJETIVOS**

1.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização química e avaliar a capacidade antioxidante de extratos de cascas de frutos de cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e de bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) em ensaios químicos.

1.2. Objetivos específicos

Identificar os compostos fenólicos por espectrometria de massas;

Determinar o conteúdo de fenólicos, antocianinas e flavonoides totais dos extratos;

Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos por diferentes ensaios químicos.

**2. MATERIAL E MÉTODOS**

2.1. Amostras

As amostras do cambuí-roxo e do bacupari foram coletadas em seus estádios de maturação mais maduros, em propriedades particulares nos municípios do Espírito Santo, Domingos Martins (-19.931572; -40.615278; 688 m) e Itaguaçu (-19.839137, -40.855494), respectivamente.

Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Cromatografia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha. A planta foi identificada pela botânica MSc. Solange Schneider, e um espécime foi depositado no herbário da UVV-ES (bacupari nº 2612; cambuí nº 2621). No laboratório, as amostras foram lavadas em água corrente e secas em temperatura

ambiente. Após esse processo, as cascas dos frutos foram retiradas manualmente, congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , liofilizadas e trituradas para posterior preparo dos extratos.

## 2.2. Caracterização química

### 2.2.1. Perfil de compostos por LC-MS/MS

A caracterização química foi realizada de acordo com (BARBOSA et al., 2018). Foram pesadas 0,1 g de amostra (previamente liofilizadas e trituradas em moinho de bolas), extraídas por sonicação usando 10 mL de uma solução de acetona:água:ácido clorídrico (70:29,9:0,1 v/v/v) e o sobrenadante obtido após a centrifugação (3500 rpm, 15 min) foram filtrados (0,45  $\mu\text{m}$ ). A separação cromatográfica foi realizada em um sistema Accela UHPLC equipado com uma bomba quaternária, um amostrador automático e um forno de coluna. A separação foi feita em uma coluna de fase reversa C18 de casca porosa (150  $\times$  2,1 mm, tamanho de partícula parcialmente porosa de 2,7  $\mu\text{m}$ ) sob eluição em gradiente com base em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (solvente A) e acetonitrila também contendo ácido fórmico a 0,1% (solvente B). Para a identificação o sistema UHPLC foi acoplado a um sistema Q-Exactive Orbitrap HRMS equipado com uma fonte de ionização por electropulverização aquecida (HESI-II) operada no modo de ionização negativa.

### 2.2.2. Preparo dos extratos

A extração foi realizada utilizando 20 g de material liofilizado para 200 mL de etanol absoluto pelo método de maceração assistida por ultrassom a 80 Hz (Elma; Elmasonic P 60H). Após 2 ciclos de 30 minutos, os extratos foram filtrados em papel filtro. Esse processo foi repetido duas vezes. As frações orgânicas foram reunidas e evaporadas através de rota evaporador (Fisatom® 802 – 1200W) até remoção do etanol (GUSS et al., 2017).

### 2.2.3. Fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais (CFT) foi realizada nos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  da amostra e 150  $\mu\text{L}$  do reagente Folin Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). Após 5 minutos, foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%. A reação ocorreu durante 90 min no escuro e a absorbância foi lida a 740 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico através de curva de calibração externa.

### 2.2.4. Conteúdo total de antocianinas monoméricas

O total de antocianinas foi determinado usando o método de pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Soluções de 5 mg/mL das amostras foram preparadas em dois tampões diferentes (cloreto de potássio e acetato de sódio). A absorbância desses extratos foi monitorada de acordo com a equação 1:  $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$ . A concentração (mg/g de extrato) de antocianinas foi expressa em cianidina-3-glicosídeo e calculada usando a equação 2:  $(A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times L)$ ; onde A é obtido na equação 1, MW é o peso molecular para cianidina-3glicosídeo, DF é o fator de diluição,  $\epsilon$  é absortividade molar (26,900), e L é o caminho ótico (1 cm).

### 2.2.5. Flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo (XU; YUAN; CHANG, 2007), com modificações. Em uma microplaca de 96 poços e fundo chato transparente, foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  do extrato (2mg/mL) e 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  2,5 % e deixado por seis minutos no escuro. Após esse tempo foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  10% e, depois de mais cinco minutos no escuro, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1M. Aguardou-

se 10 minutos, para a formação do complexo flavonoide-alumínio, à temperatura ambiente. Para a quantificação foi feita uma curva padrão com quercetina (Sigma Chemical co.) (0,1-50 µg/mL). A leitura foi realizada a 415 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Califórnia, EUA). As análises realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato.

### 2.3. Atividade antioxidante

#### 2.3.1. ABTS

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com (RE et al., 1999), com modificações. A solução estoque do cátion radical ABTS (ABTS•+) foi formado por reação de solução aquosa de ABTS (7,0 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM), mantido sob refrigeração por 24 h. Para o preparo da solução trabalho, a solução estoque foi diluída com etanol 50% até à absorbância de 1,1 (± 0,02) a 734 nm. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 30 µL de cada concentração dos compostos + 270 µl ABTS•. O branco foi feito com 30 µl de etanol 50%. A leitura foi realizada a 734 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Califórnia, EUA). A atividade sequestrante de radicais foi calculada como se segue:  $I (\%) = [(Abs0 - Abs1) / AbsO] \times 100$ , em que Abs0 era a absorbância do branco e Abs1 é a absorbância na presença do composto de teste a diferentes concentrações. Os resultados foram expressos como IR50 (concentração da amostra capaz de reduzir de 50% de radicais livres), calculada pela equação linear obtida a partir da curva de cada amostra (concentração final µg/mL vs I%).

### 2.3.2. DPPH

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelo método DPPH (SCHERER; GODOY, 2009). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 270 µl de DPPH e 30 µL de cada concentração dos compostos e a reação foi mantida no escuro por 60 minutos. O branco foi feito com 30 µl de etanol 50%. A leitura foi realizada a 517 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, Califórnia, EUA). A atividade sequestrante de radicais foi calculada como se segue:  $I (\%) = [(Abs0 - Abs1) / AbsO] \times 100$ , em que Abs0 era a absorbância do branco e Abs1 era a absorbância na presença do composto de teste a diferentes concentrações. Os resultados foram expressos como IR50 (concentração da amostra capaz de reduzir de 50% de radicais livres), calculada pela equação linear obtida a partir da curva de cada amostra (concentração final µg/mL vs I%).

### 2.3.3. Peróxido de Hidrogênio

A atividade antioxidante pelo sequestro do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi realizada segundo a metodologia de (PICK, EDGAR; KEISARI, 1980) modificada, utilizando a concentração do extrato a 500 µg/mL. Para o experimento, todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato pH 7,0. Acrescentou-se em uma microplaca de 96 poços: 25 µL da amostra teste + 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) + 20 µL de vermelho de fenol (0,1 mg/mL) + 130 µL de tampão fosfato (PBS). Por último foi adicionado 25 µL da enzima peroxidase (8,5 U/mL). Essa mistura foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos e por fim, foi adicionado NaOH (1M). A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 610 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da equação:  $I (\%) = [(AbsC - AbsT) / AbsC] \times 100$ , em que AbsC é a absorbância do controle e AbsT é a absorbância da amostra. O controle da reação foi realizado na ausência da peroxidase. Todo o experimento foi conduzido em triplicata.

#### 2.3.4. Superóxido

O método do sequestro do radical superóxido também foi empregado para avaliar a atividade antioxidante das amostras utilizando a concentração de 500 µg/mL (SUZUMURA; YASUHARA; NARITA, 1999). Para o experimento, adicionou-se em uma microplaca de 96 poços: 40 µL da amostra teste + 40 µL de nitroblue tetrazolium (NBT), 10 µL de metasulfato de fenazina (PMS), solução tampão pH 7,4 e por fim, para a formação do radical superóxido, foi adicionado 10 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A reação foi mantida por 10 minutos no escuro e a leitura realizada a 560 nm. O controle da reação ocorreu na ausência da amostra e todo o experimento foi conduzido em triplicata. O índice de redução percentual (%) do radical superóxido foi calculado através da equação:  $IR(\%) = [(AbsC - AbsT) / AbsC] \times 100$ , onde, AbsC é a absorbância média do controle e AbsT é a absorbância do teste.

#### 2.3.5. Óxido nítrico

O método da determinação indireta de óxido nítrico também foi empregado para avaliar a atividade antioxidante das amostras utilizando a concentração de 500 µg/mL (GREEN et al., 1982; MAIA et al., 2010). Para o experimento, adicionou-se em uma microplaca de 96 poços: 75 µL da amostra teste + 75 µL de nitroprussiato de sódio (NPS), e foi mantido 2 minutos sob luz UV. Após esse tempo, acrescentou-se 75 µL de sulfanilamida, foi mantido no escuro por 10 minutos e então foi adicionado 75 µL dicloridrato de N-1-nafitiletilenodiamina (NED). A leitura foi realizada a 540 nm. O controle da reação ocorreu na ausência da amostra e todo o experimento foi conduzido em triplicata. O índice de redução percentual (%) do óxido nítrico foi calculado através da equação:  $IR(\%) = [(AbsC - AbsT) / AbsC] \times 100$ , onde, AbsC é a absorbância média do controle e AbsT é a absorbância do teste.

#### 2.4. Análise estatística

Para a análise dos dados com apenas duas amostras foi utilizado o teste t de student, utilizando o software Prism 8.0.2. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

#### 3.1. Caracterização química

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados da caracterização química por LC-MS/MS. Como pode ser observado, as amostras apresentaram composição diferentes em relação ao perfil de compostos. Em comum, foram identificados em ambas as frutas os compostos fenólicos quercetina e epicatequina e o terpenoide ácido betulínico

No bacupari, os compostos majoritários foram o ácido 4-hidroxibenzóico e a epicatequina, já no cambuí o composto majoritário foi o flavonoide quercetina.

Tabela 1. Perfil de compostos das amostras através de LC-MS/MS ( $\mu\text{g}/100\text{g}$  matéria seca)

Composto	Fórmula	[M-H] <sup>-</sup>	Massa exata <i>m/z</i>	Massa experimental <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Cambuí-roxo	Bacupari
(-)-Epicatequina	C15H14O6	C15H13O6	289,07066	289,07187	4,17	190 ± 2,0	3900 ± 42
3-metilcatecol	C7H8O2	C7H7O2	123,04406	123,04522	0,546	-	704 ± 2,0
Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico	C7H6O4	C7H5O4	153,01824	153,01891	-2,758	-	65 ± 0,1
Ácido 4-hidroxibenzóico	C7H6O3	C7H5O3	137,02425	137,02425	-1,221	-	1120 ± 3,0
Ácido betulínico	C30H48O3	C30H47O3	455,35197	455,35337	3,071	171 ± 8,0	70 ± 0,1
Ácido cafeico	C9H8O4	-	-	-	-	-	-
Ácido clorogênico	C16H18O9	C16H17O9	353,08671	353,088	0,551	-	29 ± 0,2
Ácido ferúlico	C10H10O4	-	-	-	-	-	-
Ácido gálico	C7H6O5	C7H5O5	169,01315	169,01419	-0,335	-	672 ± 0,2
Ácido p-cumárico	C9H8O3	C9H7O3	163,0389706	163,03996	-0,659	-	9,4 ± 0,1
Ácido rosmarínico	C18H16O8	C18H15O8	359,07614	359,07754	0,834	-	27 ± 0,1
Ácido Sinápico	C11H12O5	-	-	-	-	-	-
Ácido Siringico	C9H10O5	-	-	-	-	-	-
Arbutina	C12H16O7	-	-	-	-	-	-
Etil galato	C9H10O5	C9H9O5	197,04445	197,04583	1,438	-	51 ± 0,1
Morina	C15H12O8	-	-	-	-	-	-
Pirocatecol	C6H6O2	-	-	-	-	-	-



Composto	Fórmula	[M-H] <sup>-</sup>	Massa exata <i>m/z</i>	Massa experimental <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Cambuí-roxo	Bacupari
Pirogalol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
Polidatina	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	389,12309	389,12436	3,253	17 ± 3,0	-
Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	301,03428	301,03552	4,122	2200 ± 20	658 ± 6,0
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	-	-	-	-	-	-

### 3.2. Composição fenólica e atividade antioxidante

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da composição fenólica e atividade antioxidante das amostras. Como pode-se observar o cambuí apresentou maior teor de fenólicos totais em comparação ao bacupari. Devido a coloração das frutas, sendo o cambuí roxo e o bacupari amarelo, as antocianinas foram quantificadas somente no cambuí e os flavonoides no bacupari.

Em relação a atividade antioxidante, o cambuí apresentou melhor atividade antioxidante no método do DPPH em relação ao bacupari. Nos métodos de óxido nítrico e superóxido o cambuí apresentou entre 20 e 30% de índice de redução, enquanto o bacupari apresentou atividade insignificante (abaixo de 10%).

Tabela 2 – Composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos das cascas de frutos de cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e de bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.).

	CambuÍ-roxo	Bacupari
Fenólicos Totais	54,8 ± 1,0a	20,9 ± 0,9b
Antocianinas Totais	125 ± 2,3	NA
Flavonoides	NA	0,62 ± 0,04
ABTS	45,1 ± 7,9a	76,1 ± 1,6b
DPPH	123 ± 6,3a	213 ± 13b
Óxido nítrico	22,9 ± 1,4	< 10%
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	< 10%	< 10%
O <sub>2</sub> •	30,1 ± 4,6	< 10%

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre as amostras (p <0,05).

\*Resultados expressos como:

Fenólicos Totais: mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato

Antocianinas Totais: mg de cianidina-3-glicosídeo/g de extrato

Flavonóides: mg de equivalentes de quercetina/g de extrato  
ABTS, DPPH: IR<sub>50</sub> – concentração da amostra em µg/mL capaz de inibir 50% dos radicais livres.  
Óxido nítrico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>: I% - porcentagem de inibição do extrato em uma concentração de 500 µg/mL.  
NA: Não se aplica.

#### 4. DISCUSSÃO

Produtos naturais, como frutas e ervas medicinais, são utilizados como prevenção e adjuvantes no tratamento de diversas doenças e suas complicações. Isso porque essas plantas possuem compostos com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos (AVILA-CARRASCO et al., 2021; BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2021; NOCE et al., 2020).

Os polifenóis têm por característica a presença de numerosas hidroxilas em suas estruturas que lhes conferem capacidade doadora de hidrogênio e, portanto, atividade antioxidante (CARDOSO et al., 2020; QU et al., 2021; STEINMANN et al., 2013).

NGUYEN et al., (2021) avaliaram fenólicos totais de diferentes extratos de cinco espécies do gênero *Garcinia* e encontraram teores de fenólicos totais entre 12 e 74 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato, valores semelhantes ao encontrado no extrato do bacupari (20,9 ± 0,9 mg EAG/g extrato).

INFANTE et al., (2016) analisaram fenólicos totais de extratos de folhas, polpas e sementes de diferentes espécies de frutos do gênero *Eugenia* e encontraram teores variando entre 15 e 100 mg EAG/g extrato, resultado similar ao encontrado no cambuí (54,8 ± 1,0 mg EAG/g extrato).

Foram identificados dois flavonoides em comum nas amostras do presente estudo, a quercetina e a epicatequina (Tabela 1), assim como em outros estudos que avaliaram extratos de diferentes frutos dos gêneros *Eugenia* e *Garcinia*, foram identificados em ambas as espécies estudadas polifenóis das classes dos ácidos fenólicos, xantonas e flavonoides (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011; DAMETTO et al., 2017;

ESPIRITO SANTO et al., 2020; FU et al., 2012; INFANTE et al., 2016; MELO et al., 2021; SCHMIDT et al., 2019).

A quercetina é um flavonoide abundante em frutas e vegetais, que está presente em frutos de ambos os gêneros estudados (AATI et al., 2022; NEHRING et al., 2022), e possui atividade antioxidante conhecida (MILANEZI et al., 2019; XU et al., 2019).

Em estudos *in vivo*, a quercetina apresentou atividade regulatória nos níveis de glutatona, que por sua vez, participa de um complexo enzimático de eliminação de radicais livres gerados pelo próprio organismo (GRANADO-SERRANO et al., 2012; KOBORI et al., 2015; XU et al., 2019). Devido às suas características e atividades biológicas, essa molécula tem sido estudada quanto a sua eficácia no tratamento e prevenção de doenças humanas (YI et al., 2021).

O tratamento com quercetina reduziu os níveis séricos de glicose e aumentou os da superóxido desmutase, uma enzima antioxidante. Além disso, melhorou o perfil lipídico e preservou as células  $\beta$  pancreáticas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (YANG; KANG, 2018).

A suplementação com quercetina também apresentou atividade como prebiótico, melhorando a diversidade bacteriana da microbiota intestinal, restaurou a barreira intestinal, assim como sua função, em camundongos tratados com antibióticos (SHI et al., 2020).

Outro flavonoide encontrado nas duas frutas analisadas foi o flavanol epicatequina (Tabela 1). Este também é comumente encontrado em frutas e vegetais e possui reconhecida atividade antioxidante, eliminando espécies reativas de oxigênio, inibindo a formação de radicais livres e a peroxidação lipídica (MASEK et al., 2017; MUSIAL; KUBAN-JANKOWSKA; GORSKA-PONIKOWSKA, 2020; QU et al., 2021).

A epicatequina foi capaz de melhorar o perfil lipídico, reduzindo colesterol total e LDL e aumentando os níveis séricos de HDL. Além disso, reduziu o estresse oxidativo, inibindo a produção do ânion superóxido em células do tecido cardíaco de ratos que receberam uma superdosagem de frutose (CALABRÓ et al., 2016).

Esse flavonoide também já apresentou atividade renoprotetora, diminuindo níveis plasmáticos de ureia e creatinina e reduzindo o estresse oxidativo em ratos induzidos com L-name (PRINCE; FRAGA; GALLEANO, 2020).

Vários fatores podem influenciar a composição de plantas, incluindo fatores intrínsecos e extrínsecos, o que afeta diretamente sua atividade biológica (GRANATO et al., 2016; LEMOS et al., 2015, 2016; SCHMIDT et al., 2019). Sendo assim, é natural que as frutas do presente estudo apresentem tanto um perfil químico, quanto atividade antioxidante diferentes.

Em estudos com produtos naturais, analisar a atividade antioxidante é um dos primeiros passos na triagem das amostras, pois fornece informações iniciais e orienta para as próximas etapas com métodos de quantificação mais apropriados, incluindo análises *in vivo* (BARBA-OSTRIA et al., 2022; MUNTEANU; APETREI, 2021).

Diferentes critérios podem ser avaliados na escolha de um método antioxidante *in vitro*, como custo, complexidade e amostra, sendo recomendada a utilização de diferentes ensaios, com diferentes mecanismos (BARBA-OSTRIA et al., 2022). Basicamente, os ensaios químicos podem ser baseados na reação de transferência de átomo de hidrogênio, na reação de transferência de elétron ou na combinação dos dois mecanismos, como ABTS e DPPH (BUNACIU et al., 2016; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Em relação à atividade antioxidante pelo método do DPPH, o cambuí apresentou melhor atividade que as polpas das espécies avaliadas por INFANTE et al., (2016), que encontraram valores que variaram entre 472,37 e 988,52 µg/mL.

Já o bacupari obteve o IR50 de  $213 \pm 13$  µg/mL enquanto um estudo prévio que analisou diferentes extratos de frutos e folhas da *Garcinia gardneriana* encontrou valores de IR50 entre  $14,27 \pm 1,36$  e  $166,64 \pm 2,70$  µg/mL.

Os radicais DPPH • e ABTS •+ não fazem parte de um sistema biológico, mas por se tratar de métodos simples e acessíveis são empregados juntamente com outros métodos, como óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, que são espécies reativas de oxigênio comumente encontrados no organismo (IVANOVA; GERASIMOVA; GAZIZULLINA, 2020; MUNTEANU; APETREI, 2021).

O óxido nítrico (NO) está presente no organismo humano e tem uma função reguladora em respostas imunes e inflamatórias (SHARMA; GOYAL; SHARMA, 2016). Porém, a superprodução desse ROS leva a um estado inflamatório que ocasiona danos teciduais (HARIJITH; EBENEZER; NATARAJAN, 2014; MARTINON, 2010). Sendo assim, compostos capazes de prevenir a indução de NO exercem efeitos anti-inflamatórios (PINHO et al., 2011; REBELO et al., 2014).

O ânion superóxido é formado pelo metabolismo humano e também tem funções no organismo, como defesa contra patógenos, mas por diversos fatores podem aumentar sua produção. Essas moléculas são altamente reativas podendo causar danos a estruturas como o DNA, por exemplo (CHOI et al., 2006; INFANTE et al., 2016; JOHANSEN et al., 2005).

Considerando a participação dessas ROS no estresse oxidativo e patogênese da inflamação, o cambuí pode ser um promissor agente anti-inflamatório pois apresentou

inibição da produção de espécies reativas como o óxido nítrico e ânion superóxido (tabela 2).

Destaca-se também que o cambuí apresentou maior atividade antioxidante em todos os métodos analisados, assim como maior teor de fenólicos totais (Tabela 2), o que pode estar correlacionado. Estudo prévio, que determinou o conteúdo fenólico pelo método Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e DPPH de 24 diferentes espécies de vegetais, encontrou alta correlação entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante (PILUZZA; BULLITTA, 2011).

ARYAL et al., (2019), também encontraram uma forte correlação entre o resultado obtido pelo método DPPH com fenólicos totais e conteúdo de flavonoides totais de oito espécies vegetais.

No presente estudo, foi avaliado o extrato etanólico das cascas das frutas e não os compostos de forma isolada. Portanto, não se pode afirmar que apenas um composto possa ser o único responsável pela atividade observada nos métodos utilizados, mesmo que majoritário. Na verdade, analisar o extrato como um todo permite observar uma possível ação sinérgica entre os compostos, assim como já foi visto na literatura (LEMOS et al., 2016).

## **5. CONCLUSÃO**

Os frutos do cambuí e do bacupari são fonte de compostos antioxidantes, capazes de neutralizar radicais livres em diferentes métodos de análise *in vitro*. Foram identificados compostos fenólicos, como os flavonoides quercetina e epicatequina em ambas as amostras. O cambuí foi a amostra que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais e melhor atividade antioxidante em todos os métodos analisados. Estudos futuros ainda são necessários para elucidar quais compostos são os responsáveis pela atividade observada.

## REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1

- AATI, H. Y. et al. *Garcinia cambogia* Phenolics as Potent Anti-COVID-19 Agents: Phytochemical Profiling, Biological Activities, and Molecular Docking. **Plants**, v. 11, n. 19, 26 Sep. 2022.
- ARYAL, S. et al. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. **Plants**, v. 8, n. 4, 11 Apr. 2019.
- AVILA-CARRASCO, L. et al. Potential therapeutic effects of natural plant compounds in kidney disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 20, 9 Oct. 2021.
- BARBA-OSTRIA, C. et al. Evaluation of biological activity of natural compounds: current trends and methods. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 14, 13 Jul. 2022.
- BARBOSA, S. et al. Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 35, p. 9353–9365, 5 Sep. 2018.
- BOOZARI, M.; HOSSEINZADEH, H. Preventing contrast-induced nephropathy (CIN) with herbal medicines: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1130–1146, Mar. 2021.
- BUNACIU, A. A. et al. Recent applications for in vitro antioxidant activity assay. **Critical reviews in analytical chemistry / CRC**, v. 46, n. 5, p. 389–399, 2 Sep. 2016.
- CALABRÓ, V. et al. Modifications in nitric oxide and superoxide anion metabolism induced by fructose overload in rat heart are prevented by (-)-epicatechin. **Food & function**, v. 7, n. 4, p. 1876–1883, Apr. 2016.
- CARDOSO, R. R. et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 128, p. 108782, Feb. 2020.
- CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442–2451, Oct. 2011.
- CHOI, H. S. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of immunoassay & immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31–44, 2006.
- DAMETTO, A. C. et al. Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) fruits and leaves. **Journal of functional foods**, v. 36, p. 490–502, Sep. 2017.
- ESPIRITO SANTO, B. L. S. DO et al. Medicinal potential of *Garcinia* species and their compounds. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 19, 1 Oct. 2020.
- FU, M. et al. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts *in vitro*. **Chinese journal of natural medicines**, v. 10, n. 2, p. 129–134, 3 Sep. 2012.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 00, n. 1, p. F1.2.1-F1.2.13, Apr. 2001.



- GRANADO-SERRANO, A. B. et al. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 2, p. 154–164, 25 Jan. 2012.
- GRANATO, D. et al. Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review. **Trends in food science & technology**, v. 52, p. 31–48, Jun. 2016.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, Oct. 1982.
- GUSS, K. L. et al. Ultrasound-assisted extraction of *Achyrocline satureioides* prevents contrast-induced nephropathy in mice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 368–374, Jul. 2017.
- HARIJITH, A.; EBENEZER, D. L.; NATARAJAN, V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 352, 29 Sep. 2014.
- INFANTE, J. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. e0152974, 6 Apr. 2016.
- IVANOVA, A.; GERASIMOVA, E.; GAZIZULLINA, E. Study of Antioxidant Properties of Agents from the Perspective of Their Action Mechanisms. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 18, 16 Sep. 2020.
- JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, p. 5, 29 Apr. 2005.
- KOBORI, M. et al. Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. **Journal of functional foods**, v. 15, p. 551–560, May 2015.
- LEMOS, M. F. et al. Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. **Industrial Crops and Products**, v. 70, n. 70, p. 41–47, Aug. 2015.
- LEMOS, M. F. et al. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. **Industrial Crops and Products**, 2016.
- MAIA, R. M. et al. Artigo Avaliação do sequestro do óxido nítrico ( NO ) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* ( Gmelin ) Howe. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. March 2009, p. 489–493, 2010.
- MARTINON, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 616–619, Mar. 2010.
- MASEK, A. et al. Antioxidant and antiradical properties of green tea extract compounds. **International Journal of Electrochemical Science**, p. 6600–6610, Jul. 2017.
- MELO, A. M. DE et al. *Garcinia brasiliensis* fruits and its by-products: Antioxidant activity, health effects and future food industry trends – A bibliometric review. **Trends in food science & technology**, v. 112, p. 325–335, Jun. 2021.
- MILANEZI, F. G. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of gold nanoparticles capped with quercetin. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 27, n. 7, p. 968–974, Nov. 2019.
- MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 25 Mar. 2021.
- MUSIAL, C.; KUBAN-JANKOWSKA, A.; GORSKA-PONIKOWSKA, M. Beneficial properties of

green tea catechins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 4 Mar. 2020.

NEHRING, P. et al. Grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lamarck) functional phytochemicals: Effect of environmental conditions and ripening process. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 157, p. 111460, Jul. 2022.

NGUYEN, N. H. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Extracts from Different *Garcinia* Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 5542938, 18 Jun. 2021.

NOCE, A. et al. Cardiovascular protection of nephropathic male patients by oral food supplements. **Cardiovascular therapeutics**, v. 2020, p. 1807941, 13 Jun. 2020.

PICK, EDGAR; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, p. 161–170, 1980.

PILUZZA, G.; BULLITTA, S. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 3, p. 240–247, Mar. 2011.

PINHO, B. R. et al. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? **Plos One**, v. 6, n. 8, p. e24098, 26 Aug. 2011.

PRINCE, P. D.; FRAGA, C. G.; GALLEANO, M. (-)-Epicatechin administration protects kidneys against modifications induced by short-term L-NAME treatment in rats. **Food & function**, v. 11, n. 1, p. 318–327, 29 Jan. 2020.

QU, Z. et al. Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 61, n. 2, p. 211–233, 2021.

REBELO, M. J. et al. Phenolic profile of Douro wines and evaluation of their NO scavenging capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food chemistry**, v. 163, p. 16–22, 15 Nov. 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, May 1999.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, Feb. 2009.

SCHMIDT, H. DE O. et al. Vitamin and bioactive compound diversity of seven fruit species from south Brazil. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 99, n. 7, p. 3307–3317, May 2019.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v. 18, n. 18, p. 757–781, Oct. 2015.

SHARMA, A.; GOYAL, R.; SHARMA, L. Potential biological efficacy of Pinus plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, p. 35, 28 Jan. 2016.

SHI, T. et al. Quercetin improves gut dysbiosis in antibiotic-treated mice. **Food & function**, v. 11, n. 9, p. 8003–8013, 23 Sep. 2020.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Oxidants and Antioxidants Part A**. Methods in Enzymology. [s.l.] Elsevier, 1999. v. 299p. 152–178.

STEINMANN, J. et al. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 5, p. 1059–1073, Mar. 2013.

SUZUMURA, K.; YASUHARA, M.; NARITA, H. Superoxide anion scavenging properties of fluvastatin and its metabolites. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 1477–1480, 1999.

XU, B. J.; YUAN, S. H.; CHANG, S. K. C. Comparative Analyses of Phenolic Composition, Antioxidant Capacity, and Color of Cool Season Legumes and Other Selected Food Legumes. **Journal of Food Science**, v. 72, 2007.

XU, D. et al. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 6, 21 Mar. 2019.

YANG, D. K.; KANG, H.-S. Anti-Diabetic Effect of Cotreatment with Quercetin and Resveratrol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Biomolecules & therapeutics**, v. 26, n. 2, p. 130–138, 1 Mar. 2018.

YI, H. et al. The therapeutic effects and mechanisms of quercetin on metabolic diseases: pharmacological data and clinical evidence. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, p. 6678662, 23 Jun. 2021.

## **CAPÍTULO 2 - Atividade nefroprotetora de extratos de cascas dos frutos do cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e do bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart).**

### **1. OBJETIVOS**

#### 1.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade nefroprotetora no modelo de nefropatia induzida por contraste em camundongos de extratos de frutos do cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e do bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.).

#### 1.2. Objetivos específicos

Determinar as concentrações séricas de ureia e creatinina dos grupos “controle” e “tratados” com os extratos;

Avaliar através dos marcadores de estresse oxidativo (AOPP e TBARS) se os extratos são capazes de proteger das lesões renais induzidas por contraste;

Avaliar as concentrações citoplasmáticas de peróxido de hidrogênio em células renais;

Avaliar a capacidade dos extratos de reduzir danos no DNA das células renais induzidos por contraste;

Avaliar a capacidade dos extratos de proteger das lesões renais induzidas por contraste através de ensaios histológicos.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Vila Velha (CEUA UVV nº 579-2020).

## 2.1. Amostras

As amostras do cambuí-roxo e do bacupari foram coletadas em seus estádios de maturação mais maduros, em propriedades particulares nos municípios do Espírito Santo, Domingos Martins (-19.931572; -40.615278; 688 m) e Itaguaçu (-19.839137, -40.855494), respectivamente. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Cromatografia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha. A planta foi identificada pela botânica MSc. Solange Schneider, e um espécime foi depositado no herbário da UVV-ES (bacupari - nº 2612; cambuí - nº 2621). No laboratório, as amostras foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. Após esse processo, as cascas dos frutos foram retiradas manualmente, congeladas a -80°C, liofilizadas e trituradas para posterior preparo dos extratos.

## 2.2. Preparação dos extratos

As extrações foram realizadas utilizando 20 g de material liofilizado de cada fruto para 200 mL de etanol absoluto pelo método de maceração assistida por ultrassom a 80 Hz (Elma; Elmasonic P 60H). Após 2 ciclos de 30 minutos, os extratos foram filtrados em papel filtro. Esse processo foi repetido duas vezes. As frações orgânicas foram reunidas e evaporadas através de rota evaporador (Fisatom® 802 – 1200W) até remoção do etanol (GUSS et al., 2017).

## 2.3. Ensaio de toxicidade oral aguda

Considerando que não existem estudos *in vivo* com o cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC), um ensaio de toxicidade oral aguda foi realizado para avaliar a segurança do extrato de acordo com o protocolo de (OECD, 2002). Os experimentos foram realizados com camundongos suíços machos (*Mus musculus*) com idade entre

8 e 12 semanas. Os animais foram aclimatados por cinco dias antes do início do protocolo, com livre acesso a água e ração. Após a aclimatação, os animais ficaram em jejum por 3-4 h, para a administração por gavagem de uma dose única do extrato (2000 mg/kg), conforme especificado pelo protocolo e 1-2 h de jejum após a administração. Foram utilizados 3 animais para o grupo controle e 3 para o grupo teste. O grupo controle recebeu o veículo (PBS) por via oral, em quantidade igual ao volume médio (0,2 mL) do composto, ambos em dose única. Após o tratamento, todos os animais foram observados de perto por 4 horas e depois diariamente por 14 dias; quaisquer mudanças comportamentais ocorridas foram anotadas. Além disso, o peso de cada animal foi monitorado ao final do período de jejum de 3-4 horas, bem como ao longo dos 14 dias após a administração da dose estudada. Após o 14<sup>o</sup> dia, foi realizada a eutanásia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 120 mg/kg por via intraperitoneal e em seguida, realizada toracotomia. O sangue foi coletado por punção cardíaca no ventrículo direito para os testes bioquímicos de marcadores de função hepática (albumina, aspartato aminotransferase [AST], alanina aminotransferase [ALT], fosfatase alcalina [ALP] e  $\gamma$ -glutamil transferase [GGT]) e marcadores de função renal (creatinina, ureia e proteína total). Os rins e fígados foram extraídos e pesados.

#### 2.4. Avaliação *in vivo* da atividade nefroprotetora

Foram utilizados camundongos suíços machos adultos (*Mus musculus*), pesando entre 25 e 40 g, obtidos no Laboratório de Monitoramento Experimental da Universidade de Vila Velha (UVV), no estado do Espírito Santo, Brasil. Esses foram acomodados em gaiolas com no máximo três animais em cada, com livre demanda de água e comida (*ad libitum*), respeitando o ciclo claro e escuro.

#### 2.4.1 Tratamentos e protocolo experimental

Os camundongos foram randomizados em sete grupos (n = 6): grupo 1: controle (CO); grupo 2: nefropatia induzida por contraste (NIC); grupo 3: N-acetilcisteína (NAC) a 200 mg/kg; grupo 4: extrato de casca de cambuí-roxo 10 mg/kg (C10); grupo 5: extrato de casca de cambuí-roxo 100 mg/kg (C100); grupo 6: extrato de casca de bacupari 10 mg/kg (B10); grupo 7: extrato de casca de bacupari 100 mg/kg (B100). Os animais foram tratados pelo procedimento de gavagem oral por 5 dias: os grupos C10 e C100 receberam soluções preparadas a partir de extrato da casca do cambuí em PBS; os grupos B10 e B100 receberam soluções preparadas a partir de extrato da casca do bacupari em PBS; os grupos CO e NIC receberam o veículo (PBS); o grupo NAC recebeu N-acetilcisteína via intraperitoneal. A indução da NIC foi realizada em todos os grupos, exceto o controle (CO) (HSING et al., 2012; LEE et al., 2006). Depois do tratamento de 5 dias, os animais foram submetidos a privação de água durante 16 h. Após esse período, foram injetados intraperitonealmente (ip) éster metílico de L-NG-nitro arginina (L-NAME, 10 mg/kg ip, dissolvido em solução salina a 0,9%) e indometacina (10 mg/kg ip, dissolvida em dimetilsulfóxido). Após 15 minutos, foi injetado um meio de radiocontraste iodado, ioversol (Optiray, 320 Mallinckrodt Medical, Inc., St. Louis, MO, 1,5 g de iodo/kg). Nos animais do grupo CO foram injetados solução salina. Após a indução, os animais tiveram livre acesso a comida e água. Os animais foram sacrificados 24 h depois, usando uma overdose de tiopental de sódio (Cristalia, São Paulo, Brasil, 200 mg/kg, i.p.) e as amostras de sangue e rins foram extraídos para exames bioquímicos e histopatológicos.

#### 2.4.2. Análise bioquímica

No momento da eutanásia, o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após a coleta, as amostras foram transferidas para um tubo de poliestireno contendo EDTA 0,33

mol/L. O plasma foi separado do sangue através de centrifugação durante 10 min a 4.000 G, sendo posteriormente armazenado à -80°C até análise. Foram avaliados os parâmetros de ureia e creatinina através de kits (GoldAnalisa).

#### 2.4.3. Preparação do homogenato renal

Após a eutanásia e coleta do sangue, foi realizado uma perfusão com PBS e os rins foram retirados, pesados e colocados em tubos com 10x o seu peso de PBS. Os rins foram colocados em tubos específicos para a lise de células, agitados a 4 m/segundo durante 30 segundos (FastPrep-24 5G, MP Biomedicals), rompendo a membrana das células e expondo todo o conteúdo intracelular para a realização dos experimentos. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 7 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em -80°C até o momento da análise.

#### 2.4.4. Avaliação do estresse oxidativo através dos Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP)

Foi realizado o ensaio do AOPP no plasma e no tecido renal (HANASAND et al., 2012). Foram adicionadas em uma placa de 96 poços de fundo chato 40 µL das amostras diluídas, 160 µL de ácido cítrico anidro 0,20 M e 10 µL de iodeto de potássio (KI) 1,16 M. Em seguida, agitou-se a placa durante 2 minutos e a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 340 nm, em um leitor de microplacas (Spectra-Mas-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), contra o branco contendo 200 µL de ácido cítrico anidro 0,20 M e 10 µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão realizada com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram expressos em µM de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).



#### 2.4.5. Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi mensurada através da reação de seus produtos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) no plasma e no tecido renal. Para isso, 43 µL de amostra, reagiu com 77 µL de ácido perclórico 7% em um tubo de poliestireno e centrifugada por 10 minutos à 7.400 rpm (MiniSpin 5452 - Eppendorf). Após os 10 minutos, 47 µL do sobrenadante foi passado para outro tubo de poliestireno e adicionado 53µl de TBA 0,06% e em seguida homogeneizado com um vórtex. Os tubos ficaram em banho-maria por 1 hora à 95°C e depois pipetados em uma placa de 96 poços e a leitura realizada em leitor de microplaca (Spectra-Mas-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) à 532 nm. A quantificação da peroxidação lipídica foi calculada com base em uma curva padrão realizada com o malondialdeído (MDA), principal produto formado pela quebra de ácidos graxos polinsaturados e normalizada com a quantificação de proteínas totais realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976; MOSELHY et al., 2013; PATOCKOVÁ et al., 2003; SPIRLANDELI; DEMINICE; JORDAO, 2014).

#### 2.4.6. Determinação dos níveis citoplasmáticos de ROS de células renais

Após a perfusão com solução tampão PBS um rim foi retirado, seccionado em duas partes e em córtex e medula. O tecido foi picado com PBS utilizando um bisturi cirúrgico. Em seguida, a suspensão celular foi filtrada através de uma tela de nylon (BD, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA, Falcon 70 µm), transferidas para um microtubo, centrifugadas (1200 RPM por 10min), o sobrenadante descartado, as amostras ressuspendidas em solução de congelamento contendo soro fetal bovino (95%) e DMSO (5%) e então congeladas a -80°C até análise posterior (DIAS et al.,

2014; GOMES et al., 2014). As células da medula foram descongeladas com solução de descongelamento (DMEN 20% SFB) à 37°C, centrifugadas (1600 RPM por 10min) e ressuspensas em 1 mL de PBS. Em uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi adicionado 20 µL de solução de DCF-DA (10 µM) e o volume completado para 1000 µL e a solução foi incubada, no escuro, por 30 minutos à 37°C. Para o controle positivo, foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM por 5 minutos e para controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em PBS. Após a marcação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas com PBS e mantidas ao abrigo da luz até a aquisição dos dados no citômetro. A aquisição dos dados foi realizada com citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488 nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtro de 530/30 nm.

#### 2.4.7. Avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino

O ensaio cometa alcalino foi realizado segundo CAMPAGNARO, (2008) com modificações. As amostras de sangue frescas foram homogeneizadas com solução agarose 1% (Low Melting Point Agarose-LMA), colocadas em lâminas de vidro pré-preparadas com uma camada de agarose, cobertas com uma lamínula e resfriadas à 4°C. Para a lise da membrana celular e nuclear, as lamínulas foram retiradas e as lâminas passaram por uma solução de lise a 4°C (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO. pH – 10) durante 1 hora e em seguida lavadas com água destilada e PBS gelados. Para o desnovelamento do DNA as lâminas lavadas foram colocadas em cuba de eletroforese e recobertas com solução de eletroforese a 4°C (300 mM NaOH e 1,0 mM EDTA – pH 13) por 40 minutos. A eletroforese foi realizada à 4°C por 20 minutos, a 300 mA e 32 V. Em seguida, as lâminas foram retiradas da cuba e cobertas com solução de neutralização a 4°C (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5), lavadas em três ciclos de 5 minutos cada, fixadas com metanol

PA gelado durante 2 minutos e deixadas secar por 12 h. Para análise, as lâminas foram coradas com 35 µL de brometo de etídio (20 µg/mL), cobertas com lamínulas, e fotografadas em microscopia de fluorescência e analisadas pelo programa CASP 98 (domínio público). Foram analisadas 50 células aleatórias por animal, utilizando a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda para análise do dano ao DNA.

#### 2.4.8. Histologia renal

Após a perfusão com solução tampão PBS um rim foi retirado, seccionado em duas partes longitudinalmente e armazenado em solução de paraformaldeído a 4% e refrigeradas até a análise. As amostras, então, foram submetidas a banhos em série de etanol em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e em xilol, com posterior inclusão na parafina. Em seguida, os blocos foram seccionados no micrótomo (Leica, German) com secções de 5µm de espessura, aderidas as lâminas, as quais foram corados com hematoxilina eosina (HE) padrão. As lâminas foram lidas e fotografadas em microscópio óptico (Leica DM500) usando objetiva de 40x, e câmera digital (Leica ICC50 HD) acoplada. A lesão tubulointerstitial (ILTI), caracterizada por atrofia tubular e glomerular, vacuolização, espessamento da membrana basal, dilatação tubular e vazamento de proteínas, foi avaliada por análise semiquantitativa utilizando o software ImageJ (BÔA et al., 2015 - adaptado). Foram avaliados vinte campos corticais de cada animal com ampliação de 40x e classificados de acordo com uma escala de 0 a 4 da seguinte forma: Grau 0, sem lesão tubulointerstitial; Grau 1, <25% do tubulointerstício lesionado; Grau 2, 25–50% do tubulointerstício lesionado; Grau 3, 51-75% do tubulointerstício lesionados; e Grau 4, 76 100% do tubulointerstício lesionados.

O índice de ILTI foi calculado para cada animal multiplicando-se o número de campos com grau I pelo numeral um, com grau II por dois, III por três e IV por quatro. Os

valores foram somados e divididos pelo número de campos avaliados, incluindo aqueles com escore de grau zero. As imagens foram examinadas por pesquisadores cegos para os grupos experimentais das amostras.

#### 2.4.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após a perfusão com solução tampão PBS um rim foi retirado, seccionado em duas partes longitudinalmente e armazenado em solução de paraformaldeído a 4% e refrigeradas até a análise. As amostras foram lavadas em tampão de cacodilato 0,1 M três vezes por 30 minutos cada e depois submetidas a um processo de crioproteção com glicerol 30% em tampão de cacodilato 0,1 M. Após 3 horas, todo o crioprotetor foi retirado e as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e fraturadas com o auxílio de uma pinça previamente resfriada. Em seguida, as amostras foram desidratadas em graus crescentes de etanol (30 a 100%), secas em ponto crítico em CO<sub>2</sub> (Autosandri-815, Tousimis), revestidas com 10 nm de ouro puro em um pulverizador de vácuo (Mesa V, Denton Vacuum) e analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV) em modo direto.

#### 2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância uma via (ANOVA) usando o software Prism (Prism 8.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Quando a ANOVA apresentou diferenças significativas, o teste de Tukey foi usado para análise post hoc. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

### 3.1. Ensaio de toxicidade oral aguda

Estudos prévios utilizando o bacupari em animais já existem e comprovam a segurança da utilização dessa fruta em modelos animais (ARAÚJO et al., 2019; MOREIRA et al., 2017, 2018). Porém, devido a inexistência de artigos utilizando extratos das cascas do cambuí-roxo em ensaios *in vivo*, foi realizado o ensaio de toxicidade oral aguda, onde uma dose muito alta é administrada (OECD, 2002). Ao final dos 14 dias, não ocorreram óbitos por isso todos os 6 animais foram eutanasiados. Como pode ser observado na Tabela 1, nenhum dos parâmetros avaliados se diferenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e tratados, indicando que, dentro do tempo avaliado de 15 dias após a administração do extrato, não houve danos hepáticos e renais, portanto, indicando que a administração oral do extrato da casca do cambuí-roxo não ocasionou toxicidade aguda nos animais.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros analisados para toxicidade oral.

Parâmetros	Controle	Cambuí
Peso (g)	34,4 ± 1,21a	32,9 ± 6,03a
Creatinina (mg/dL)	0,34 ± 0,03a	0,33 ± 0,03a
Ureia (mg/dL)	34,3 ± 2,08a	34,7 ± 7,37a
ALT (U/L)	12,0 ± 5,29a	8,67 ± 2,31a
AST (U/L)	108 ± 11,3a	114 ± 4,95a
FA (U/L)	8,00 ± 1,73a	7,67 ± 0,58a
GGT (U/L)	5,33 ± 1,15a	5,67 ± 2,89a
Proteínas totais (mg/dL)	3,87 ± 0,35a	4,00 ± 0,36a
Albumina (mg/dL)	1,60 ± 0,20a	1,17 ± 0,21a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; GGT:  $\gamma$ -glutamil transferase.

### 3.2. Análise bioquímica

Nas figuras 1 e 2 estão apresentados os resultados de creatinina e ureia dos grupos experimentais. A nefropatia induzida por contraste (NIC) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis séricos tanto de ureia como de creatinina, confirmando o desenvolvimento de lesão renal no modelo experimental. Em relação a creatinina, ambos os tratamentos foram capazes de prevenir a lesão renal caracterizada pela redução desse biomarcador de forma dose dependente (figura 1), sendo que o cambuí reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) nas duas doses administradas e o bacupari apenas na dose de 100 mg/kg de peso.

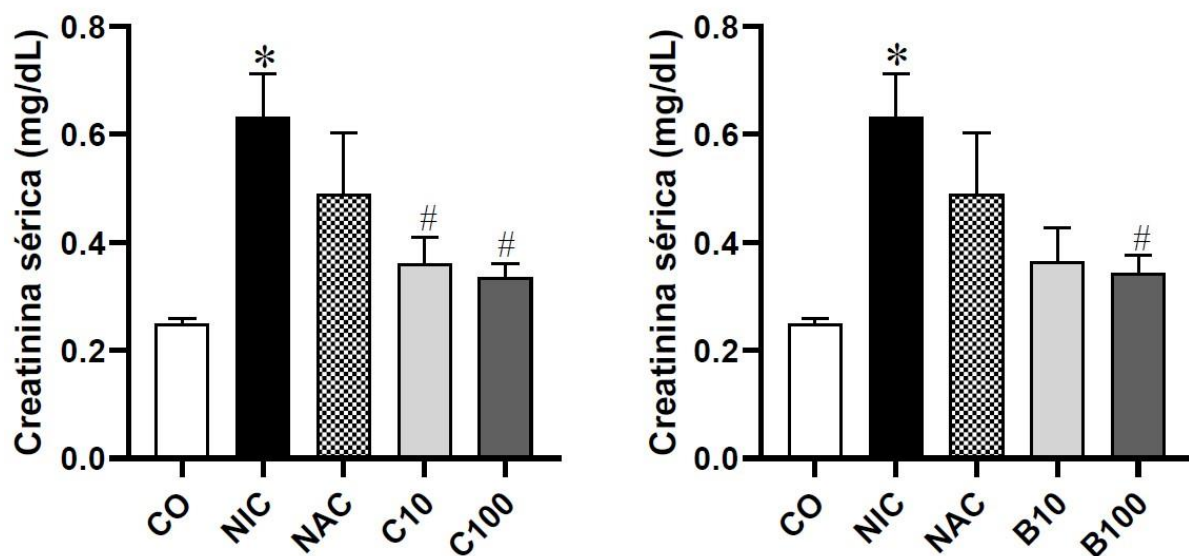


Figura 1. Quantificação da creatinina plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

Já em relação a concentração plasmática de ureia, a menor dose dos extratos se mostrou mais eficiente (figura 2). Ambos os tratamentos, com o cambuí e com o

bacupari em 10 mg/kg de peso foram capazes de prevenir significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento dos níveis séricos de ureia.

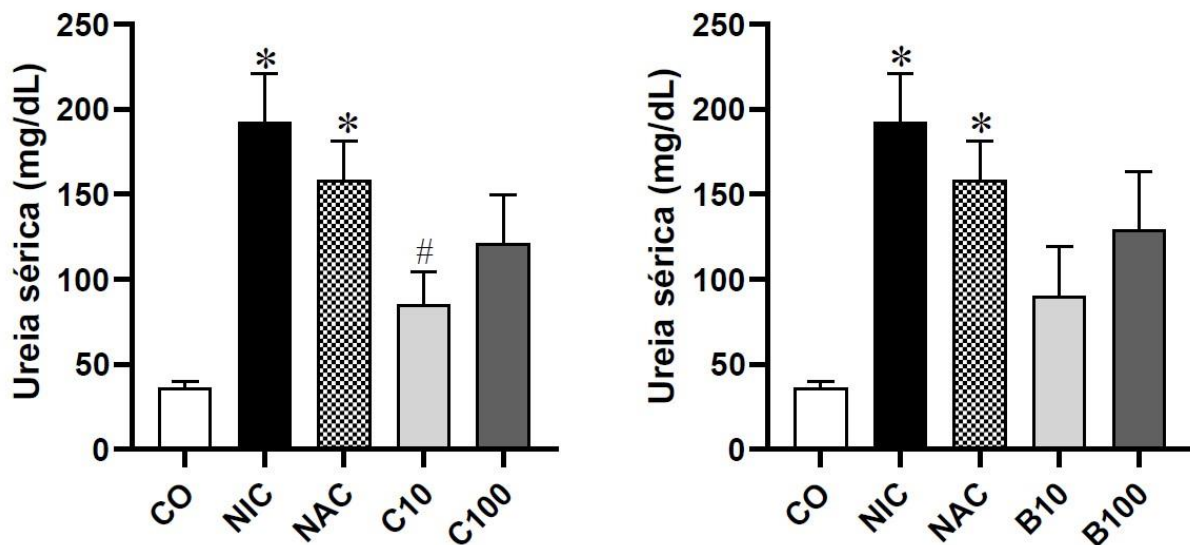


Figura 2. Quantificação da ureia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

Nas figuras 1 e 2 também podemos perceber que o grupo NAC se diferenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle, ou seja, o tratamento convencional não foi capaz de reduzir os níveis séricos desses marcadores, reforçando a importância de encontrar substitutos para NAC na clínica.

### 3.3. Avaliação dos Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP).

Na figura 3 estão apresentados os resultados da análise de estresse oxidativo através da quantificação dos produtos de oxidação proteica no plasma. A indução da NIC aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a oxidação proteica quando comparado ao grupo controle, indicando que a lesão renal leva a um estresse oxidativo sistêmico. O tratamento com bacupari foi capaz de reduzir significativamente essa oxidação quando comparado ao grupo NIC, se mostrando um potencial agente protetor no estresse oxidativo causado pela lesão renal induzida por contraste. Em contrapartida,

o tratamento convencional com N-acetilcisteína e o tratamento com o cambuí não se diferenciaram estatisticamente do grupo NIC.

Mas podemos ressaltar que o cambuí não se diferenciou do grupo controle, demonstrando que o tratamento impediu um aumento significativo desse parâmetro.

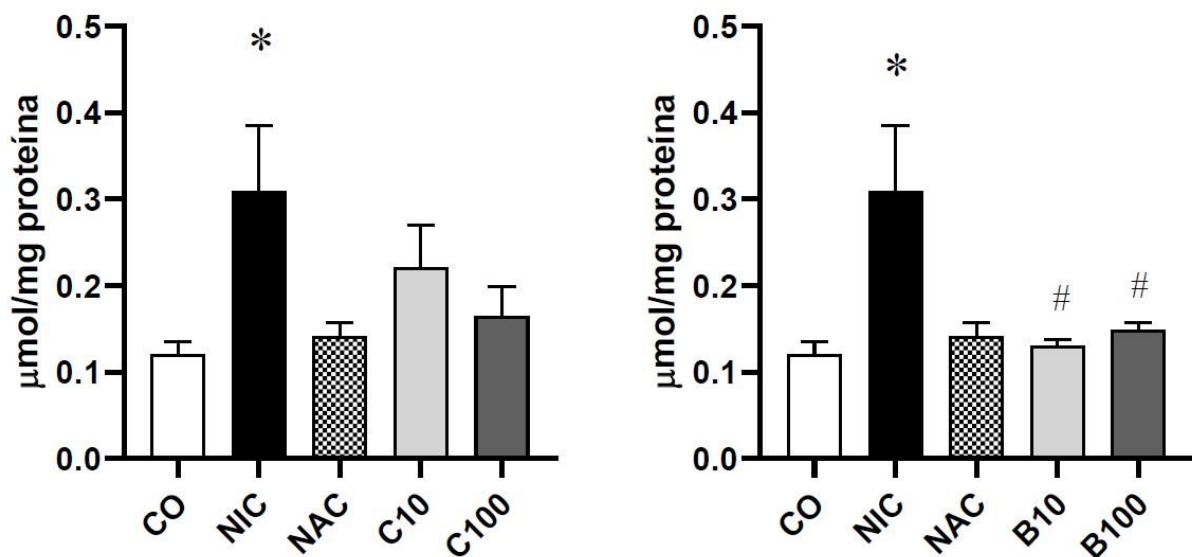


Figura 3. Quantificação da oxidação proteica (AOPP) no plasma nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

Os produtos proteicos de oxidação também foram quantificados no tecido renal, a fim de verificar o estresse oxidativo local. Na figura 4, podemos observar que não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle e NIC. Mas observamos que o grupo tratado com cambuí em 10 mg/kg obteve uma redução desses produtos quando comparados com o grupo NIC.



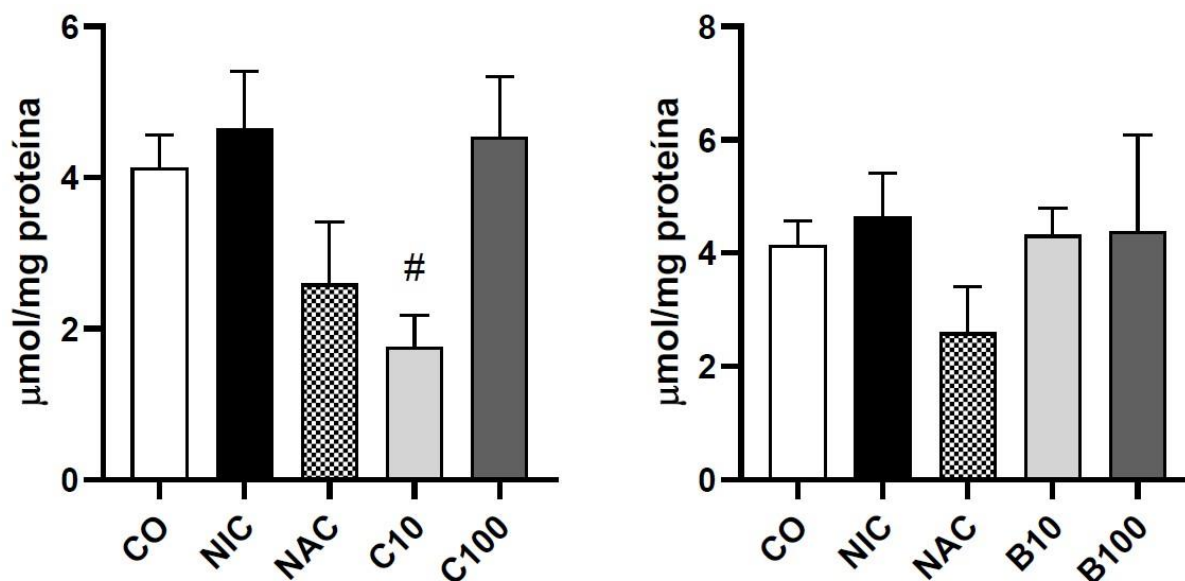


Figura 4. Quantificação da oxidação proteica (AOPP) no tecido renal nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para n = 5-6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

### 3.4. Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação da peroxidação lipídica foi realizada para avaliar o estresse oxidativo sistêmico e local (plasma e no tecido renal), porém não apresentou diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais, como pode ser observado nas figuras 5 e 6.

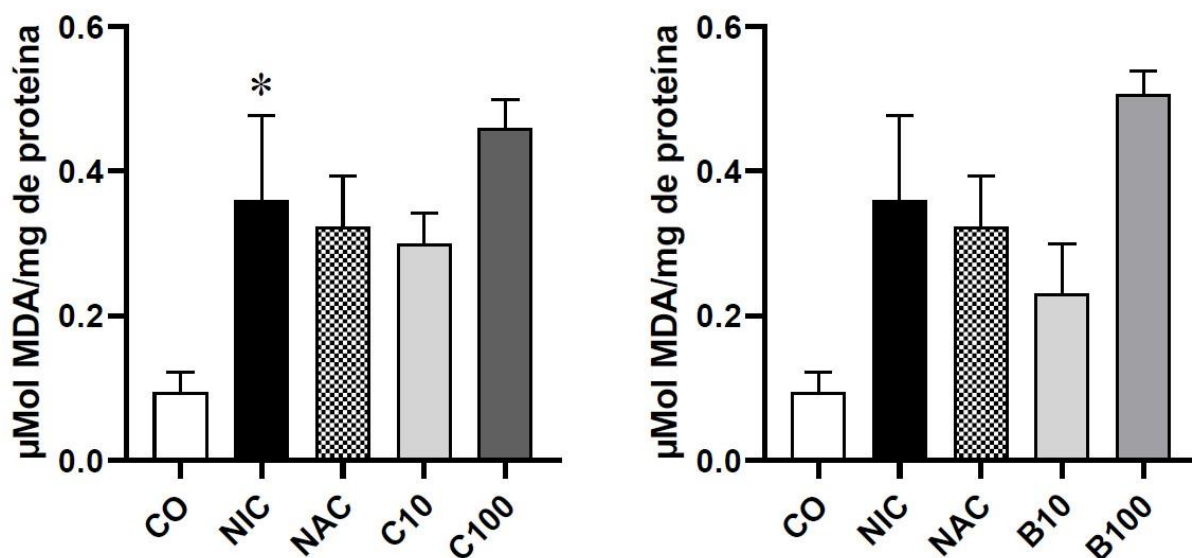


Figura 5. Quantificação da peroxidação lipídica no plasma dos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

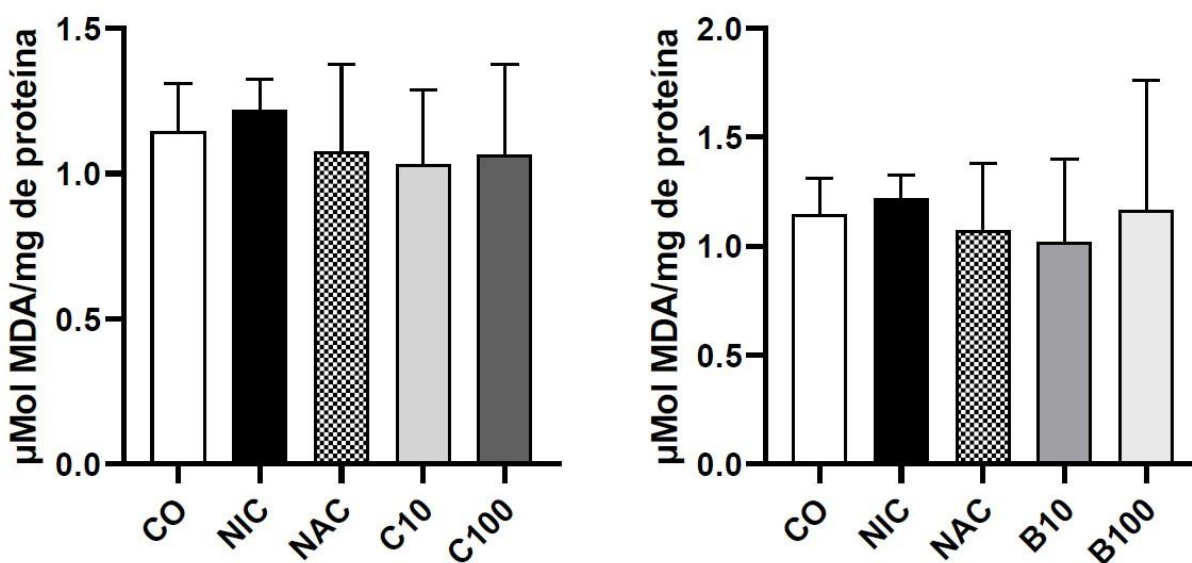


Figura 6. Quantificação da peroxidação lipídica no tecido renal dos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

O ensaio do TBARS geralmente é utilizado como um indicador de estresse oxidativo em amostras biológicas, porém, não é um ensaio robusto, variáveis relacionadas à amostra, manuseio e, principalmente, ao armazenamento podem ter um grande

impacto nos resultados (AZIZI et al., 2016; DE LEON; BORGES, 2020). Possivelmente, por isso, no presente estudo o ensaio do TBARS não apresentou diferenças entre os grupos, inclusive entre grupo controle e NIC.

### 3.5. Determinação dos níveis citoplasmáticos de ROS de células renais

A figura 7 evidencia uma superprodução de peróxido de hidrogênio no tecido renal do grupo NIC em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a nefropatia induzida por contraste provoca um aumento de ROS no tecido renal. Os tratamentos com as frutas apresentaram capacidade de reduzir significativamente essa produção de ROS, como visualizado na figura 7.

Vale ressaltar que a prevenção convencional com NAC não foi capaz de reduzir significativamente o aumento dos níveis renais de ROS.

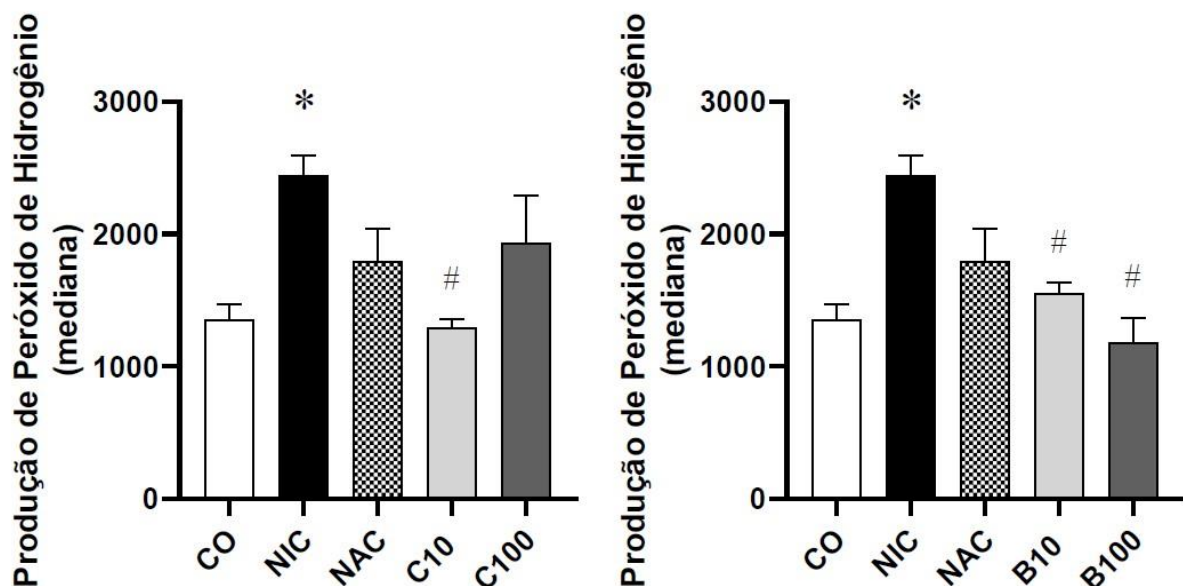


Figura 7. A produção de ROS nas células da medula renal avaliada por DCF medidos por citometria de fluxo. Gráficos de barras mostrando a média da produção de peróxido de hidrogênio nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 4$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

### 3.6. Avaliação do dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino

Outro parâmetro avaliado para análise de estresse oxidativo e suas consequências foi o dano do DNA de células sanguíneas. Na figura 8A, estão as imagens típicas da análise das lâminas do cometa por microscópio, onde pode ser observado que o grupo NIC apresenta maior fragmentação em relação ao grupo controle e aos tratamentos. A quantificação dessa fragmentação está apresentada nas figuras 8B e 8C, onde se observa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do grupo NIC em relação ao grupo controle, assim como observa-se uma proteção dos tratamentos, indicada pela redução significativa da fragmentação da célula de todos os tratamentos em relação ao grupo NIC, indicando que os tratamentos com os extratos das cascas das frutas foram capazes de reduzir o dano no DNA induzido por contraste.

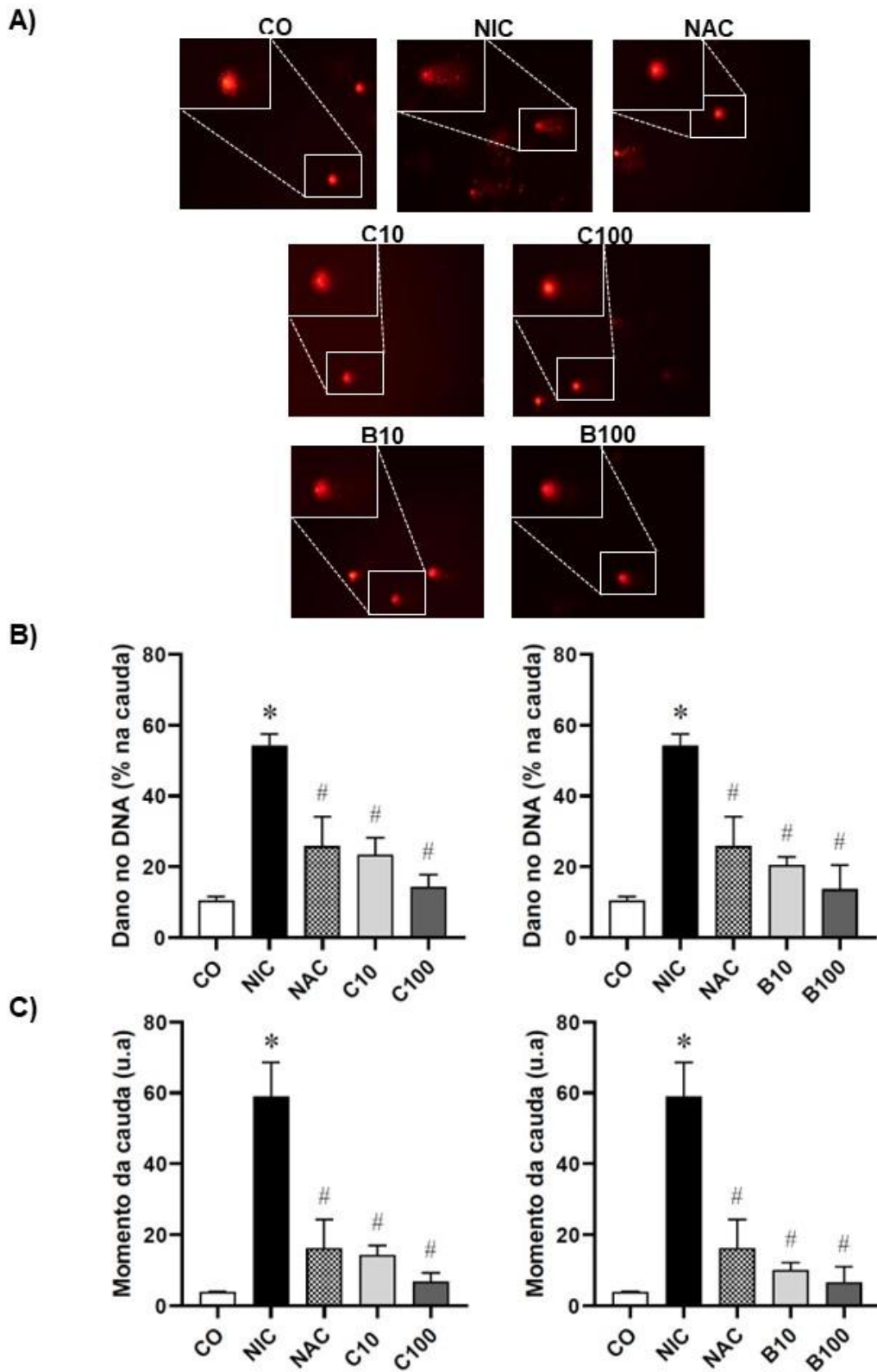


Figura 8. A) Cometas típicos mostrando a variação da fragmentação de DNA de amostra de sangue dos grupos experimentais, quantificado e representado em gráfico no painel inferior. B) Gráficos de barras mostrando a média da porcentagem de dano ao DNA em amostra de sangue dos grupos experimentais. C) Gráficos de barras mostrando a média do momento da cauda nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média

± EPM para n = 3 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

### 3.7. Histologia renal

As imagens histológicas (figura 9) evidenciam que o grupo NIC apresentou danos na microarquitetura renal, caracterizado por atrofia glomerular, dilatação tubular com congestão luminal, vacuolização de células epiteliais tubulares e presença de debris protéicos na luz tubular quando comparado ao grupo controle.

O tratamento convencional com NAC e todas as doses frutas usadas preservaram as estruturas em comparação com o grupo NIC, não sendo observado diferenças entre as doses, ou seja, tanto as menores doses, quanto as maiores foram eficazes na proteção estrutural.

Para que a análise da histologia não ficasse somente por uma observação subjetiva, uma análise semiquantitativa foi realizada e as imagens classificadas de acordo com o índice de lesão tubulointersticial. Os resultados dessa quantificação estão na figura 10, onde é possível observar que o contraste danifica o tecido renal, aumentando significativamente ( $p < 0,05$ ) esse índice de lesão, enquanto todos os tratamentos foram capazes de prevenir esses danos no tecido, apresentando um índice significativamente menor ( $p < 0,05$ ), não se diferenciando entre as doses. Esses resultados corroboram com o que pode ser observado nas imagens na figura 9.



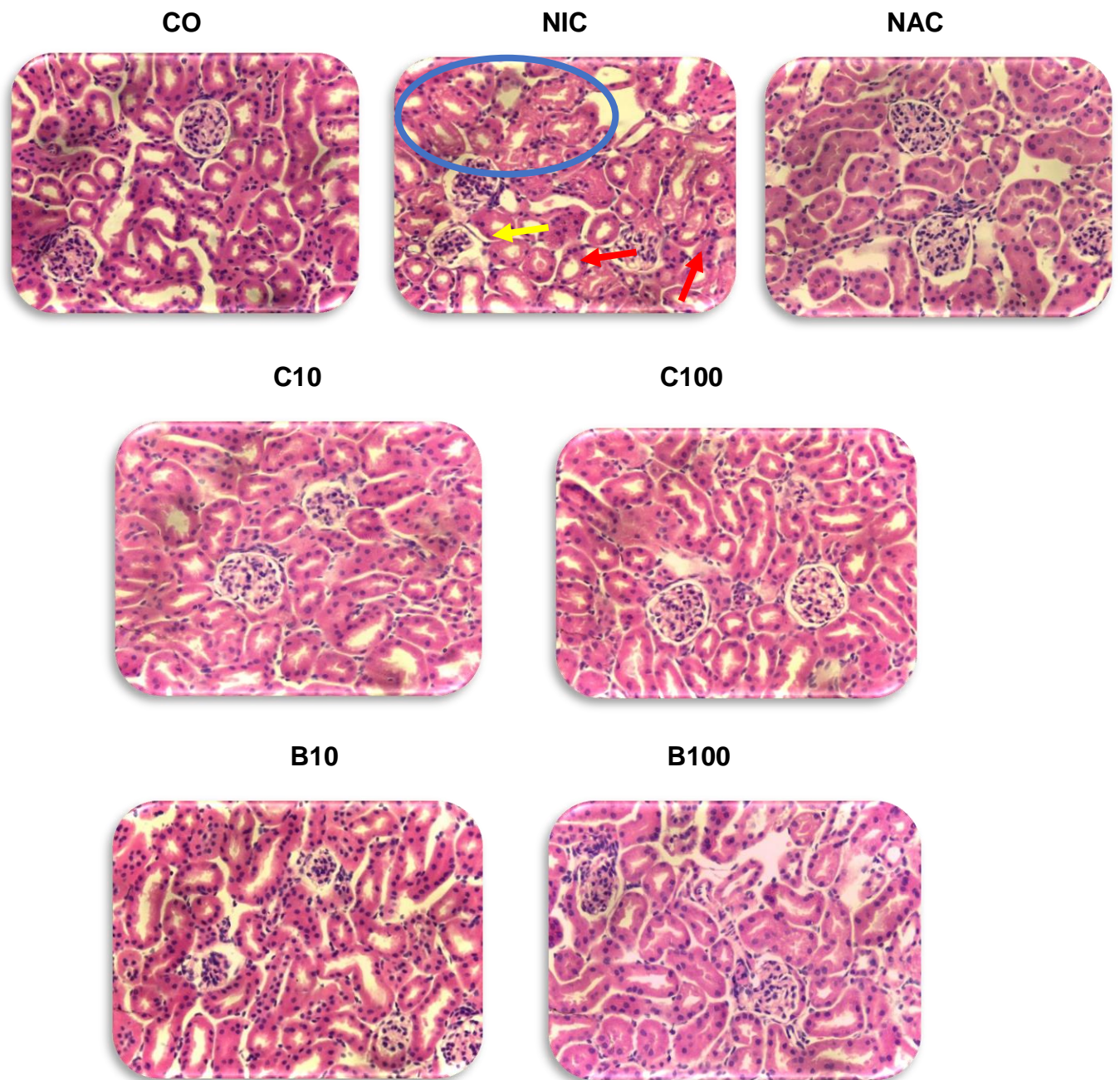


Figura 9. Micrografias representativas do córtex renal (coradas com HE) nos diferentes grupos experimentais. No grupo NIC podem ser observadas as características da lesão renal: atrofia glomerular (seta amarela), dilatação tubular e vazamento de proteínas (setas vermelhas) e vacuolização (círculo azul).

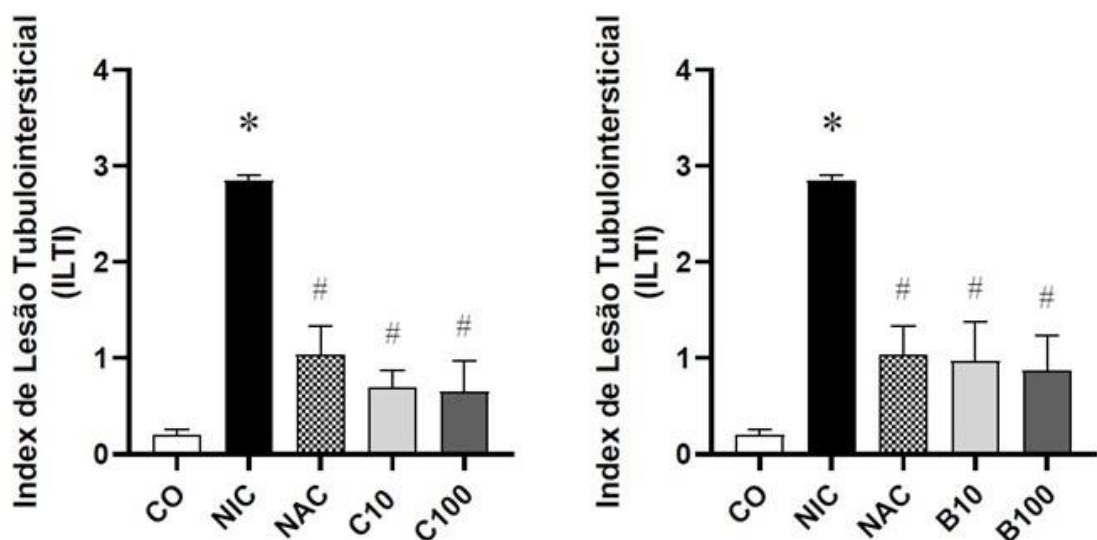


Figura 10. Gráficos de barras mostrando a média dos índices de lesão tubulointersticial (ILTI) de todos os grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 3$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. CO e # $p < 0,05$  vs. NIC (ANOVA uma via, seguida de post-hoc de Tukey).

### 3.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No grupo CO, observamos as estruturas típicas dos túbulos renais, onde é possível observar a parede com bordas integras e lúmen sem obstrução (Figura 11). Enquanto no NIC é possível observar perda de coesão estrutural, onde as bordas dos túbulos perderam definição e houve fechamento do lúmen tubular, provavelmente devido a toxicidade tubular e processo inflamatório causado pelo contraste.

Nos grupos tratados, tanto nas amostras de frutas, quanto no grupo NAC é possível observar a túbulos e bordas preservadas e lúmen menos obstruídos, indicando a capacidade dos tratamentos de reduzir das lesões causadas por contraste nas estruturas renais.



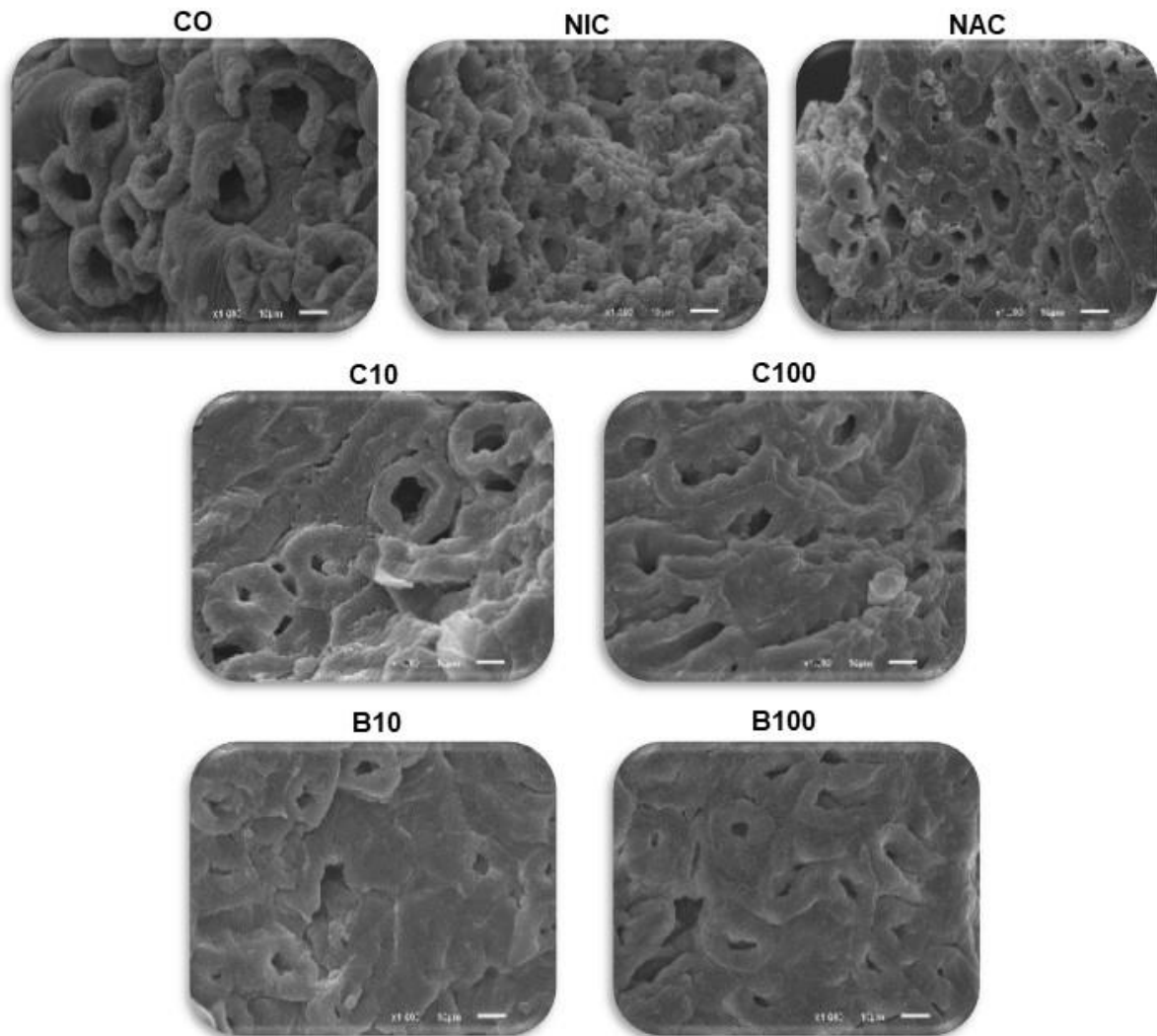


Figura 11. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de tecido renal dos diferentes grupos experimentais mostrando imagens das estruturas tubulares (barra de escala = 10 μm).

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos anteriores avaliaram a capacidade nefroprotetora de plantas dos gêneros *Garcinia* e *Eugenia* em outros modelos animais de doenças renais. SONFACK et al., (2021) demonstraram que o extrato aquoso da casca do caule de *Garcinia lucida* Vesque possui efeitos cardioprotetores e nefroprotetores em modelo de doença renal crônica induzida por adenina em ratos.

As xantonas obtidas de espécies de *Garcinia* também apresentaram efeitos renoprotetores em modelos animais hipertensos e de doença renal crônica induzida por chumbo (MARIANO et al., 2021; RANA; TANGPONG; RAHMAN, 2020). E a *Eugenia jambolana* foi capaz de atenuar a progressão do dano renal em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (GROVER et al., 2001).

Mas, pela primeira vez, o presente estudo traz os resultados dos tratamentos preventivos dos extratos das cascas do cambuí-roxo (*Eugenia candolleana* DC) e do bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) em modelo murino de nefropatia induzida por contraste. Demonstrando que tais tratamentos foram capazes de reduzir o desenvolvimento da NIC, preservando a função renal, reduzindo o estresse oxidativo e atenuando as incidências de lesões renais glomerulares e tubulares, como demonstrado pela investigação histológica.

Diversos fatores estão envolvidos na complexa patologia da NIC, como mecanismos hemodinâmicos, apoptose e inflamação (ZHANG; LU; WANG, 2020). Como esperado, o grupo NIC apresentou valores elevados de ureia e creatinina plasmáticas (figuras 1 e 2), confirmando o desenvolvimento da lesão aguda renal no modelo utilizado. Isso ocorre pois o contraste aumenta a viscosidade dos fluidos tubulares, diminuindo o fluxo urinário, que por consequência diminui a excreção desses produtos do metabolismo (HOSTEN, 1990; NORRIS et al., 2018; ZHANG; LU; WANG, 2020).

Além disso, a viscosidade do fluido tubular aumenta a exposição do tecido ao meio de contraste, ocasionando efeitos citotóxicos nas células epiteliais, que apresentam edema, vacuolização e entram em apoptose. Essas células necróticas se desprendem das membranas basais, obstruindo o lúmen (MCCULLOUGH et al., 2016; ZHANG; LU; WANG, 2020), como pode ser observado no grupo NIC nas figuras 9 e 11.

A disfunção das células endoteliais leva à uma vasoconstrição e por consequência diminuição do fluxo sanguíneo renal, o que desencadeará em isquemia medular (DUGBARTEY; REDINGTON, 2018; HEYMAN; ROSEN; ROSENBERGER, 2008; MCCULLOUGH et al., 2016). Essa hipóxia medular aumenta a produção de radicais livres na mitocôndria (KAN et al., 2018), por isso, foi avaliado a produção de ROS nas células da medula renal. Na figura 7 pode-se observar que houve uma superprodução de peróxido de hidrogênio pelas células medulares no grupo NIC, enquanto os tratamentos apresentaram capacidade de reduzir essa produção de ROS, demonstrando que os extratos possuem atividade antioxidante.

Considerando que o estresse oxidativo gerado pelos os níveis aumentados de ROS, causa consequências como a oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, fragmentação do DNA e alterações morfológicas (KHALEEL et al., 2019; VALKO et al., 2006; WITKO-SARSAT et al., 1996), a redução dos níveis citoplasmáticos de ROS vista nos tratamentos (figura 7) pode estar relacionada a melhora do parâmetro de AOPP (figuras 3 e 4), preservação do DNA observada no ensaio do cometa (figura 8) e manutenção da coesão estrutural do tecido renal vista na histologia e microscopia eletrônica de varredura (figuras 9, 10 e 11).

Corroborando com nossos achados, BÔA et al., (2015), evidenciaram que há uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio induzida pelo contraste, ocasionando em um estresse oxidativo sistêmico e local e que esse seria um dos principais fatores no desenvolvimento da NIC. Dessa forma, produtos naturais com atividade antioxidante seriam promissores na prevenção de doenças renais (BÔA et al., 2015; BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2021; GUSS et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

Assim como as outras espécies dos gêneros *Eugenia* e *Garcinia*, o cambuí e o bacupari possuem compostos fenólicos em sua composição, como o ácido gálico, ácido clorogênico, epicatequina e quercetina e já demonstraram atividade antioxidante em ensaios químicos (resultados do capítulo 1).

GUSS et al., (2017), demonstraram que o tratamento prévio com quercetina foi capaz de reduzir a concentração plasmática de ureia no mesmo modelo animal utilizado no presente estudo. Porém, os autores destacam que o extrato da planta (*Achyrocline satureioides*) testado obteve melhores resultados, indicando um efeito sinérgico de sua composição.

BÔA et al., (2015), identificaram 3 fenólicos na resina da *Virola oleífera*, ácido ferúlico, ácido gálico e quercetina. O tratamento com essa resina rica em polifenóis foi capaz de reduzir a disfunção renal e as alterações morfológicas causadas pelo contraste em camundongos.

Já foi demonstrado que a epicatequina, encontrada nas amostras do cambuí e bacupari (tabela 1), tem potencial protetor na doença renal crônica, provavelmente relacionada às vias de inflamação e apoptose (BAO; PENG, 2016).

Em modelo animal de lesão renal induzida por L-name, a administração de epicatequina demonstrou capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de ureia e creatinina, diminuir a produção do ânion superóxido e induzir a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase e catalase (PRINCE; FRAGA; GALLEANO, 2020).

Sendo assim, a presença desses compostos nas frutas testadas pode estar relacionada aos efeitos nefroprotetores observados no presente estudo. Porém, deve-se considerar que foram utilizados extratos brutos das cascas, que possuem uma

composição complexa e, portanto, outros compostos também podem estar contribuindo, até mesmo de forma sinérgica, para tal atividade renoprotetora.

Vale ressaltar que em alguns parâmetros analisados, as menores doses (10mg/kg de peso) apresentaram efeitos melhores que a maior dose (100mg/kg de peso), não sendo necessária a utilização de altas doses para conseguir o efeito desejado. Como pode ser visto na análise da ureia (figura 2), AOPP plasmático e tecidual (figura 3 e 4), TBARS plasmático (figura 5) e destaca-se a análise de determinação citoplasmática de ROS (figura 7).

Compostos antioxidantes, como os polifenóis, dependendo das concentrações e das condições da reação, podem apresentar efeito pró-oxidante. Sendo assim, é importante ressaltar que os produtos naturais não são isentos de efeitos adversos e seu uso indiscriminado deve ser evitado (CAROCHO; FERREIRA, 2013; CHOBOT; HADACEK, 2011; PIZZINO et al., 2017; SOTLER et al., 2019).

## **5. CONCLUSÃO**

Em conclusão, este estudo demonstra pela primeira vez que os extratos das cascas dos frutos do cambuí-roxo e do bacupari foram capazes de diminuir a lesão renal causada por contraste em camundongos, reduzindo parâmetros bioquímicos de função renal, prevenindo o dano oxidativo sistêmico e tecidual e preservando estrutura morfológica dos rins.

Esses efeitos renoprotetores observado pode estar associado a atividade antioxidante desses extratos, pois os tratamentos preventivos foram capazes de reduzir a produção citoplasmáticas de peróxido de hidrogênio. Além disso, essa capacidade antioxidante pode estar relacionada a atividade antígeno-tóxica observada pelo ensaio de dano no DNA.

Sendo assim, os extratos avaliados se mostraram promissores e estudos futuros podem avaliar a aplicação dessas frutas em outras doenças, como a doença renal crônica.

Estudo futuros também podem avaliar outros parâmetros de avaliação de função renal, como proteinúria, por exemplo.

## REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2

ARAÚJO, F. DE O. et al. Bacupari (*Garcinia brasiliensis*) extract modulates intestinal microbiota and reduces oxidative stress and inflammation in obese rats. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 122, p. 199–208, Aug. 2019.

AZIZI, S. et al. A possible reason for the low reproducibility of malondialdehyde determinations in biological samples. **Bioanalysis**, v. 8, n. 21, p. 2179–2181, Nov. 2016.

BAO, H.; PENG, A. The Green Tea Polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate and its beneficial roles in chronic kidney disease. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 99–103, 1 Sep. 2016.

BÔA, I. S. F. et al. Resin from *Virola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0144329, 16 Dec. 2015.

BOOZARI, M.; HOSSEINZADEH, H. Preventing contrast-induced nephropathy (CIN) with herbal medicines: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1130–1146, Mar. 2021.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 May 1976.

CAMPAGNARO, B. P. **Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células tronco da medula óssea de camundongos**. Master thesis—[s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 11 Aug. 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, Jan. 2013.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 16, n. 6, p. 242–247, 2011.

DE LEON, J. A. D.; BORGES, C. R. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Journal of Visualized**

**Experiments**, n. 159, 12 May 2020.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p. 35, 6 Feb. 2014.

DUGBARTEY, G. J.; REDINGTON, A. N. Prevention of contrast-induced nephropathy by limb ischemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical effects. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 314, n. 3, p. F319–F328, 1 Mar. 2018.

GOMES, I. B. S. et al. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. **Lipids in health and disease**, v. 13, p. 184, 6 Dec. 2014.

GROVER, J. K. et al. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 233–238, Aug. 2001.

GUSS, K. L. et al. Ultrasound-assisted extraction of *Achyrocline satureioides* prevents contrast-induced nephropathy in mice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 368–374, Jul. 2017.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 18 May 2012.

HEYMAN, S. N.; ROSEN, S.; ROSENBERGER, C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 1, p. 288–296, Jan. 2008.

HOSTEN, A. O. BUN and Creatinine. In: WALKER, H. K.; HALL, W. D.; HURST, J. W. (Eds.). . **Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations**. 3rd. ed. Boston: Butterworths, 1990.

HSING, C.-H. et al.  $\alpha$ 2-Adrenoceptor agonist dexmedetomidine protects septic acute kidney injury through increasing BMP-7 and inhibiting HDAC2 and HDAC5. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 303, n. 10, p. F1443-53, 15 Nov. 2012.

KAN, C. et al. Ischemia-Reperfusion Injury in Aged Livers-The Energy Metabolism, Inflammatory Response, and Autophagy. **Transplantation**, v. 102, n. 3, p. 368–377, Mar. 2018.

KHALEEL, S. A. et al. Contrast media (meglumine diatrizoate) aggravates renal inflammation, oxidative DNA damage and apoptosis in diabetic rats which is restored by sulforaphane through Nrf2/HO-1 reactivation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 309, p. 108689, 25 Aug. 2019.

LEE, H. T. et al. A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 290, n. 6, p. F1367-75, Jun. 2006.

MARIANO, L. N. B. et al. Prolonged Diuretic and Renoprotective Effects of a Xanthone Obtained from *Garcinia achachairu* Rusby in Normotensive and Hypertensive Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 5510053, 20 Apr. 2021.

- MCCULLOUGH, P. A. et al. Contrast-Induced Acute Kidney Injury. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 13, p. 1465–1473, 27 Sep. 2016.
- MOREIRA, M. E. DE C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of functional foods**, v. 29, p. 143–153, Feb. 2017.
- MOREIRA, M. E. DE C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduces the biometry, lipogenesis and hepatic steatosis in obese rats. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 114, p. 169–177, Dec. 2018.
- MOSELHY, H. F. et al. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 3, p. 852–858, Mar. 2013.
- NORRIS, K. C. et al. Albuminuria, serum creatinine, and estimated glomerular filtration rate as predictors of cardio-renal outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and kidney disease: a systematic literature review. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 36, 9 Feb. 2018.
- OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. [s.l.] OECD Publishing, 2002.
- PATOCKOVÁ, J. et al. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 52, n. 4, p. 455–460, 2003.
- PIZZINO, G. et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 8416763, 27 Jul. 2017.
- PRINCE, P. D.; FRAGA, C. G.; GALLEANO, M. (-)-Epicatechin administration protects kidneys against modifications induced by short-term L-NAME treatment in rats. **Food & function**, v. 11, n. 1, p. 318–327, 29 Jan. 2020.
- RANA, M. N.; TANGPONG, J.; RAHMAN, M. A. Xanthones protects lead-induced chronic kidney disease (CKD) via activating Nrf-2 and modulating NF-κB, MAPK pathway. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 21, p. 100718, Mar. 2020.
- SANTOS, V. DE S. et al. Silymarin protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. **Life Sciences**, v. 228, p. 305–315, 2019.
- SONFACK, C. S. et al. The Aqueous Extract from the Stem Bark of *Garcinia lucida* Vesque (Clusiaceae) Exhibits Cardioprotective and Nephroprotective Effects in Adenine-Induced Chronic Kidney Disease in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 5581041, 13 Mar. 2021.
- SOTLER, R. et al. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. **Acta clinica Croatica**, v. 58, n. 4, p. 726–736, Dec. 2019.
- SPIRLANDELI, A. L.; DEMINICE, R.; JORDAO, A. A. Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. **International journal of sports medicine**, v. 35, n. 1, p. 14–18, Jan. 2014.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 10 Mar. 2006.



WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, p. 1304–1313, May 1996.

ZHANG, F.; LU, Z.; WANG, F. Advances in the pathogenesis and prevention of contrast-induced nephropathy. **Life Sciences**, v. 259, p. 118379, 15 Oct. 2020.