

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR DA *CALYCOPHYLLUM*  
*SPRUCEANUM* (MULATEIRO) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À  
NEFROPATIA POR DICLOFENACO DE SÓDIO**

**DAYANE BERTOLLO COZER**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO/ 2024**

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR DA *CALYCOPHYLLUM*  
*SPRUCEANUM* (MULATEIRO) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À  
NEFROPATIA POR DICLOFENACO DE SÓDIO**

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

**DAYANE BERTOLLO COZER**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2024**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

C834a

Cozer, Dayane Bertollo Cozer

Avaliação do efeito nefroprotetor da *calycophyllum spruceanum* (mulateiro) em camundongos submetidos à nefropatia por diclofenaco de sódio / Dayane Bertollo Cozer. – 2024.

30 f. : il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2024.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Rins – Doenças. 3. Estresse oxidativo. I. Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

**DAYANE BERTOLLO COZER**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR DA CALYCOPHYLLUM  
SPRUCEANUM (MULATEIRO) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À  
NEFROPATIA POR DICLOFENACO DE SÓDIO**

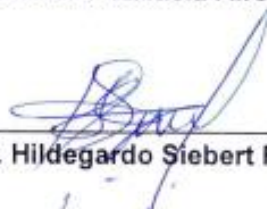
Dissertação apresentada à Universidade  
Vila Velha, como pré-requisito do  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas, para a obtenção do grau de  
Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rafaela Aires - UVV



Prof. Dr. Hildegardo Siebert França - IFES



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira – UVV  
Orientador

**Dedicatória: Dedico esta pesquisa a todos meus familiares e pacientes e profissionais da área que de alguma forma servirá para ampliar os estudos sobre esse tema.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por estar sempre ao meu lado nos dias mais lindos e difíceis.

Aos meus filhos Vitor e Maria Clara, que tão pequenos podem entender o quanto é importante fazermos nosso trabalho da melhor forma possível mesmo que precisamos nos sacrificar um pouco.

Ao meu Pai, Anildo Cozer, *in memoriam*, agradeço por todo incentivo ao estudo, toda capacidade de entendimento e sabedoria, e todo legado que deixou.

A minha Mãe, Laudete por estar sempre presente, e incentivando o meu crescimento.

As minhas irmãs por serem exemplos de garra e determinação a seguir.

Ao Professor Thiago por ter me possibilitado tanto conhecimento ao longo desse período, e a todos os Professores envolvidos nessa Pós-Graduação.

Aos amigos que sempre presente incentivam minha caminhada, mesmo distantes, estão a fazer grande diferença na minha vida.

Bom caminho a todos nós, e o meu “Muito Obrigada” por tudo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	8
3.2 GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	8
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	12
3.4 PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO RENAL PARA REALIZAÇÃO DA AOPP E TBARS.....	13
3.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DOS PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA (AOPP).....	14
3.6 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ATRAVÉS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	15
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4.RESULTADOS.....	16
5.DISSCUSSÃO.....	20
6.CONCLUSÃO.....	22
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Organograma resumido dos experimentos. Representado pelos grupos e quantidades de animais utilizados (N). O Grupo (CON) se refere ao grupo CONTROLE, composto por animais saudáveis, em número de 6, tratados por gavagem com água destilada (AD). Este grupo não foi induzido com Diclofenaco de Sódio. A partir do Grupo NAC (N: de 6 animais, tratamento com n-acetilcisteína 200mg/kg por via intraperitoneal) todos os grupos foram induzidos à nefropatia com Diclofenaco de sódio. O Grupo NEF (Nefropatia induzida, os animais foram um total de 8 e tratados com água destilada (AD) assim como no grupo (CON). Grupos M50, M300 e M1000 foram respectivamente tratados com a espécie estudada (Mulateiro) nas dosagens de 50mg/kg; 300mg/kg e 1000mg/kg. O número de animais tratados nesses grupos foram entre 6 a 12 (N). **9**
- Figura 2.** Fotografia da planta *Calycophyllum spruceanum* (Mulateiro) [53] **9**
- Figura 3.** Fotografia da planta *Calycophyllum spruceanum* (Mulateiro) triturado conforme pesquisa realizada no Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos da UFAC [53] **10**
- Figura 4.** Organograma cronológico dos experimentos. Foram um total de 7 dias de experimento (D1-D7). Do dia 1 ao 5 (D1-D5): tratamento dos animais com solução AD por gavagem, n-acetilcisteína por via intraperitoneal ou Mulateiro via gavagem. No dia 5/6 (D5 e D6): representam os dias de indução da nefropatia por Diclofenaco de sódio; as caixas retangulares acima representam os grupos e respectivos N e concentrações de tratamentos realizados para cada grupo durante os 5 primeiros dias e a seta inferior a ordem **11**



cronológica sobre a indução da Nefropatia induzida por AINES até a eutanásia do animal (D7).

- Figura 5.** Fotografia da centrifugação do sangue coletado para preparação do plasma para realização das concentrações séricas de creatinina e uréia por métodos laboratoriais padronizados – UVV. **12**
- Figura 6.** Fotografia da preparação do Homogenato Renal – UVV. **13**
- Figura 7.** Quantificação de ureia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON,  $p < 0,05$  vs. grupo NEF e  $p < 0,05$  vs. grupo NAC (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). **17**
- Figura 8.** Quantificação de creatinina plasmática nos grupos experimentais. Gráfico de dispersão: os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e # $p < 0,05$  vs. grupo NIC. (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). **18**
- Figura 9.** Quantificação da oxidação proteica do soro (AOPP), que apenas o Mulateiro na dose mais alta mostra efeitos antioxidantes. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e  $p < 0,05$  vs. grupo NEF (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey). **19**

**Figura 10.** Análise de TBARS em grupos controle, Nefro e com Mulateiro induzido nefropatia com diclofenaco de sódio, observa-se um aumento nos níveis de stress oxidativo entre os animais do grupo Nefro (NEF) nos tempos 7 dias em relação ao grupo controle. **20**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos proteicos de oxidação avançada
AMP	adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroximetiltolueno butilato
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
COM	Grupo controle tratado com veículo
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido etileno diamina tetra acético
<i>et al.</i>	<i>et alli – e colaboradores</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
i.p	Via intraperitoneal
LRA	Lesão Renal Aguda
M 50	Grupo tratado com mulateiro 50 mg/kg
M 300	Grupo tratado com mulateiro 300mg/kg
M1000	Grupo tratado com mulateiro 1000 mg/kg
NAC	Grupo tratado com n-acetilcisteína 200mg/kg
NF-κB	Fator nuclar Kapa B
NTA	Necrose tubular aguda
PBS	Solução salina tamponada
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCP	Túbulo Contorcido Proximal
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UVV	Universidade Vila Velha
v.o	Via oral
v.s	<i>Versus</i>

## RESUMO

COZER, DAYANE BERTOLLO, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro 2024. **AVALIAÇÃO DO EFEITO NEFROPROTETOR DA *CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM* (MULATEIRO) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR DICLOFENACO DE SÓDIO.** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

A nefropatia induzida por antiinflamatórios pode levar a perda da função renal em pacientes submetidos ao uso prolongado de AINES, para os quais ainda não há uma proteção eficaz analisada em estudos anteriores. Neste estudo, objetivamos avaliar o possível papel nefroprotetor do antioxidante mulateiro, um produto natural extraído das cascas da espécie da região Amazônica *Calycophyllum Spruceanum*. Camundongos suíços machos adultos foram separados em 6 grupos e pré-tratados oralmente com mulateiro (50, 300 e 1000 mg/kg), N-acetilcisteína (200 mg/kg) via intraperitoneal ou veículo (NIC e controle) durante 5 dias antes da indução da nefropatia induzida por AINES. A função renal foi quantificada pelos níveis plasmáticos de creatinina e ureia. Foi quantificada também através de biomarcadores indiretos (lipídicos e proteicos) a intensidade de estresse oxidativo, nos rins de animais dos grupos estudados, por meio de marcadores de oxidação lipídica (TBARS) e proteica (AOPP). Este estudo demonstra pela primeira vez que o extrato vegetal do Mulateiro diminui o dano oxidativo sistêmico e renal preservando a função renal de forma dose-dependente (sendo apenas observado em doses elevadas de 1000 mg/Kg). Portanto, o Mulateiro pode ter aplicações clínicas promissoras contra a nefropatia induzida por diclofenaco mais pelas propriedades antioxidantes do que pela proteção da funcionalidade (clearance) renal.

**Palavras-chave:** nefropatia induzida por anti-inflamatórios (AINES), lesão renal aguda (LRA), Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

COZER, DAYANE BERTOLLO, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, February 2024. **EVALUATION OF THE NEPHROPROTECTIVE EFFECT OF CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM (MULATEIRO) IN MICE SUBJECTED TO NEPHROPATHY BY DICLOFENAC SODIUM.** Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira.

Anti-inflammatory drug-induced nephropathy can lead to loss of renal function in patients undergoing prolonged use of NSAIDs, for whom there is still no effective protection analyzed in previous studies. In this study, we aimed to evaluate the possible nephroprotective role of the antioxidant mulateiro, a natural product extracted from the bark of the species *Calycophyllum Spruceanum* from the Amazon region. Adult male Swiss mice were separated into 6 groups and pretreated orally with mulateiro (50, 300 and 1000 mg/kg), N-acetylcysteine (200 mg/kg) intraperitoneally or vehicle (NIC and control) for 5 days before induction of NSAID-induced nephropathy. Renal function was quantified by plasma creatinine and urea levels. The intensity of oxidative stress in the kidneys of animals from the studied groups was also quantified using indirect biomarkers (lipids and proteins). through lipid (TBARS) and protein (AOPP) oxidation markers. This study demonstrates for the first time that Mulateiro plant extract reduces systemic and renal oxidative damage, preserving renal function in a dose-dependent manner (only observed in high doses of 1000 mg/kg). Therefore, Mulateiro may have promising clinical applications against diclofenac-induced nephropathy more for its antioxidant properties than for the protection of renal functionality (clearance).

**Keywords:** anti-inflammatory drug (NSAID)-induced nephropathy, acute kidney injury (AKI), oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são medicamentos amplamente utilizados tanto no Brasil quanto no cenário mundial [1,2,3]. Contudo, a crescente popularidade dessas drogas, somada aos efeitos adversos nos rins, tem levantado preocupações acerca do uso indiscriminado de AINEs, tornando-se um problema reconhecido e potencialmente perigoso para a fisiologia renal. [3,4] Apesar de serem geralmente considerados seguros, é importante reconhecer que, mesmo em doses terapêuticas, os AINES podem apresentar riscos associados à função renal justificando o crescente número de estudos nesta área nos últimos anos [4,5].

Dentre os AINEs mais consumidos no mundo, o ibuprofeno está em primeiro lugar (~20%), seguido do AAS (11%) e em terceiro lugar (~6.5%), o diclofenaco (2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil acetato) [59], que é o fármaco explorado em nossa investigação. Como AINE não seletivo, o diclofenaco possui propriedades analgésicas, antipiréticas, além das clássicas propriedades anti-inflamatórias. No entanto, tem sido associado ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda (IRA), conforme demonstrado por vários estudos experimentais [60,61] além de clínicos [6,7].

A ação farmacológica dos AINEs depende da dose e do tempo utilizado, o que predispõe acometimento de órgãos específicos, sendo o rim, o segundo mais acometido depois da mucosa gástrica. Portanto, é uma das drogas que, se utilizada em longo prazo, aumenta a morbidade principalmente de idosos, visto que utilizam vários medicamentos (anti-hipertensivos, antidepressivos, anticoagulantes, lítio) que ainda podem gerar interações medicamentosas, por diversos mecanismos [8]. Esses pacientes têm alta probabilidade de desenvolver lesão renal, que pode ser transitória ou irreversível, podendo comprometer a habilidade de excreção de fármacos co-administrados [62]. Um grupo de pacientes ainda mais vulnerável ao impacto dos AINES são as pessoas com doença renal crônica, que podem apresentar um aumento de 3 a 4 vezes de riscos de efeitos adversos [9].

## 1.1 Como os AINES podem comprometer a função renal?

A vasodilatação renal induzida por PGs é crítica para a manutenção de uma adequada perfusão renal, por meio de PGE2 e PGI2. As principais alterações hidroeletrólíticas e acidobásicas provocadas por essa classe são a retenção sódica (causando edema e hipertensão), hipercalemia e acidose metabólica decorrentes da menor atividade de COX-1 e COX-2 [15].

Fatores de risco, como comorbidades e a idade avançada, geram pacientes mais suscetíveis aos efeitos adversos dos AINEs, haja vista a perda característica de néfrons nesses casos [10]. Assim, tais fatores, combinados com os efeitos vasoconstritores renais resultantes da inibição das prostaglandinas, podem levar, em pacientes idosos, a desordens renais, como a síndrome nefrótica, a hipercalemia, e hiponatremia e até mesmo a falência renal [10].

A inibição de prostaglandinas renais resulta em deterioração aguda da função renal após a ingestão de AINEs. Exemplos de relatórios de toxicidade humana incluem evidências de que o uso de diclofenaco por mulheres grávidas afeta a função renal até mesmo em recém-nascidos [16]. Há relatos também em adultos sem história prévia ou fatores de risco para doença renal, que o diclofenaco também induz nefrotoxicidade [17,18]. Em grupos mais vulneráveis, já foram descritos casos de intoxicação em pacientes pediátricos [19] e idosos com desenvolvimento de complicações renais [18]. Quanto a reversibilidade dessas lesões os achados clínicos são discrepantes. Por exemplo, um paciente apresentou lesão tubular aguda transitória induzida por diclofenaco, que foi revertida após a retirada do diclofenaco [6]. Por outro lado, lesões renais agudas (LRA) por AINES podem levar à recuperação renal incompleta e até mesmo acelerar a progressão para doença renal crônica (DRC) [20]. A IRA é definida como redução ou perda súbita da função renal, resultando em incapacidade em excretar compostos nitrogenados [11,12] acompanhada ou não da diminuição da diurese e falha da capacidade de concentrar a urina [13]. A IRA é caracterizada por ocorrer dentro de horas ou dias após a exposição ao agente agressor e geralmente é causada por agressão de origem tóxica ou isquêmica sobre os rins, capaz de provocar lesão nas células epiteliais do túbulo contorcido proximal

(TCP) e porção ascendente da alça de Henle, prejudicando a regulação do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido base [14].

Em animais experimentais (como em camundongos), o diclofenaco induz a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e assim, produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- $\kappa$ B, que, em última análise, pode contribuir para apoptose das células renais [21]. Além disso, sabe-se que o efeito nefrotóxico do diclofenaco também envolve o comprometimento da função mitocondrial no rim, que medeia espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando estresse oxidativo (desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes), fragmentação induzida do DNA, estimulando assim o desenvolvimento da apoptose [22, 23].

Em suma, estudos já demonstram que o direto efeito da lesão renal induzida por diclofenaco vai além da inibição da síntese de prostaglandinas: há também um efeito direto nas mitocôndrias renais, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando lesões de DNA e apoptose [22,24]. Esta compilação de dados levantam a preocupação sobre os efeitos citotóxicos relacionados ao uso crônico, abuso e/ou overdose de AINEs, como o diclofenaco.

## **1.2 Consequências da nefropatia induzida por AINES**

Os agentes nefrotóxicos interferem nas funções essenciais das células tubulares, causando lesão e morte celular [25]. A isquemia renal promove insuficiência de substrato e hipóxia celular, que provoca degradação da adenosina trifosfato (ATP) intracelular para adenosina difosfato e adenosina monofosfato (AMP). O AMP pode ser degradado posteriormente a outros nucleotídeos de adenina que se difundem para fora da célula impedindo a síntese de novo ATP [26]. Com isso, a redução intracelular de ATP leva a danos metabólicos graves e alterações estruturais nas células tubulares renais, como o aumento intracelular de cálcio e a produção de radicais livres que ativam as proteases e fosfolipases levando a subsequente dano celular [27,28].



Todas essas alterações nos rins podem contribuir para o desenvolvimento de necrose tubular aguda (NTA) ou apoptose. Na apoptose, a célula se desintegra em vesículas ligadas por membrana contendo os detritos celulares chamadas corpos apoptóticos, que são fagocitados sem causar lesão tecidual ou inflamação [29,30].

Pode haver a progressão de pacientes que não interrompem AINEs quando apresentam nefrite intersticial aguda e fibrose intersticial [31]. Um estudo recente em população idosa mostra que, independentemente da classe do AINE (se seletivo para COX-1 ou não) tanto altas doses quanto com maior meia-vida aumentam significativamente o risco de desenvolvimento de DRC [32,33].

### **1.3 Produtos naturais como potenciais agentes nefroprotetores**

O interesse crescente em produtos naturais para o tratamento de enfermidades por parte da população se dá, principalmente, pela crença de que estes produtos são isentos de efeitos colaterais e que podem ser eficazes em casos onde a medicina tradicional não atendeu ao esperado (o que nem sempre é confirmado cientificamente) [34,35]. Por outro lado, não se pode desprezar a gama de substâncias potencialmente protetoras que podem ainda estar contidas em diversas espécies da biodiversidade mundial, especialmente em nosso país e que devem ser exploradas em investigações experimentais, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento da etnofarmacologia [57].

Como consequência, o interesse acadêmico pelo estudo de espécies vegetais e seu uso tradicional em diferentes partes do mundo também tem crescido, visando o uso dos princípios ativos como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos, sejam eles sintéticos, quimicamente modificados, e até mesmo adjuvantes e fitofármacos [36,37,38,39]

Para a validação do uso de plantas no tratamento de doenças, os estudos, etnobotânicos, etnofarmacológicos químicos, farmacológicos e toxicológicos são de grande importância, pois fornecem resultados importantes na pesquisa de

novos produtos ativos de origem vegetal contribuindo na seleção de espécies de plantas a serem avaliadas [40,41].

As pesquisas voltadas para o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo produtos derivados de plantas medicinais, com eficácia, segurança e qualidade constante têm conquistado um número crescente de pesquisadores em todo o mundo e principalmente no Brasil [42].

#### **1.4 *Calycophyllum spruceanum* (ou pau-mulato-de-várzea, escorregamacaco e pau-marfim), mulateiro**

Nesse estudo, será avaliada a aplicabilidade da *Calycophyllum spruceanum* que é uma espécie natural da região amazônica, conhecida no Brasil como pau-mulato, mulateiro, pau-mulato-de-várzea, “escorrega macaco” e pau-marfim [43,44,45].

Várias ações biológicas são citadas no uso popular, principalmente a aplicação sobre a pele com função anti-inflamatória e antimicrobiana [46]. Inclui também o uso contraceptivo, chá para prevenção de envelhecimento, controle de doenças gástricas e uterinas, distúrbios do aparelho geniturinário, hipercolesterolemia, disfunções da tireóide e para tratar diabetes [47,48]. Além dessa ampla gama de doenças, também tem sido amplamente apreciada por suas funções cosmetológicas, dentre elas, rejuvenescimento, hidratante curativo de rugas, cicatrizante (bastante usado em cortes, feridas e queimaduras), como protetor solar, no tratamento de manchas na pele, e como fortalecedor no controle de queda para os fios do couro cabeludo [49,50,51,52].

Por meio de espectrometria de massa e cromatografia líquida, com a amostra da planta, estudos comprovam a presença de derivados cafeoilquínicos (POLIFENÓIS), pequenos ácidos orgânicos, além de outros seis compostos fenólicos [64].

Em recente estudo foi verificado através de prospecção fotoquímica preliminar do extrato bruto da casca da *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), a presença

de taninos catéquicos, flavonóides, alcaloides, depsídeos e depsidonas. No extrato bruto das folhas revelou-se a presença de taninos catéquicos, depsídeos e depsidonas, derivados da cumarina e alcaloides [65]

Estudos com a espécie, demonstraram uma poderosa capacidade antioxidante de *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), comparável a dos antioxidantes padrão, como a vitamina C e o polifenol epigallocatequina galato (EGCG) [63]

Neste estudo, investigamos um possível papel nefroprotetor desse composto da *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), ricos em polifenóis, no contexto da nefropatia induzida por antiinflamatórios com objetivo de obter dados que demonstrem sua influência nefroprotetora através de diferentes tipos de biomarcadores fisiológicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar em camundongos Swiss machos, possível efeito nefroprotetor da *Calycophyllum Spruceanum* (Mulateiro) quando submetidos a lesão renal aguda por anti-inflamatório - AINEs.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar na literatura possíveis aplicações antioxidantes da espécie da região Amazônica *Calycophyllum Spruceanum*;
- Revisar na literatura possíveis investigações na área de nefroproteção da espécie *Calycophyllum Spruceanum*;
- Determinar as concentrações séricas de biomarcadores renais, como creatinina e ureia e dos grupos “controle” e “tratados” em diferentes doses
- Comparar se o extrato da espécie *Calycophyllum Spruceanum* é mais eficaz na nefroproteção comparada à terapia convencional com N-acetilcisteína (NAC);
- Quantificar através de biomarcadores indiretos (lipídicos e proteicos) a intensidade de estresse oxidativo, nos rins de animais dos grupos estudados. por meio de marcadores de oxidação lipídica (TBARS) e proteica (AOPP);
- Mensurar através de biomarcadores indiretos (lipídicos) a intensidade de estresse oxidativo no plasma de animais dos grupos estudados. por meio de marcadores de oxidação lipídica (TBARS).

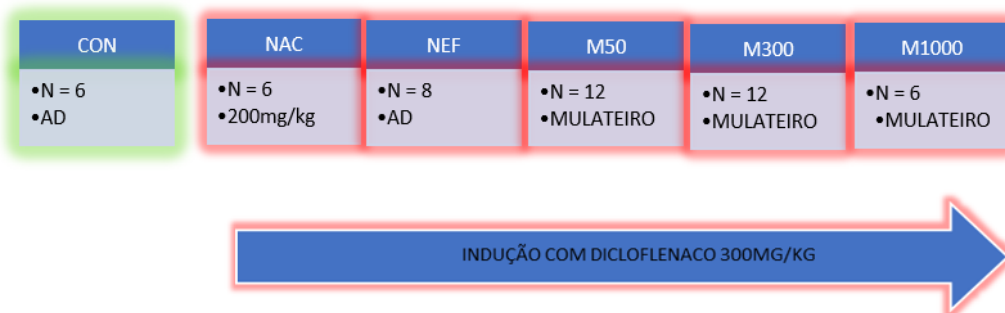
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos suíços machos, pesando entre 30-45g, provenientes do Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV. Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas com maravalhas, à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade ( $60 \pm 10\%$ ), com ciclos claro/escuro de 12 horas, controlados automaticamente e em ambiente com exaustão de ar. Os camundongos foram alimentados com ração comercial padrão para roedores (Nutri Laboratório Roedores - Nutriave) *ad libitum* e tiveram livre acesso a água potável até o início do tratamento. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA-UVV, protocolo nº 667-2023).

#### 3.2 Grupos e delineamento experimental

Para indução da Lesão Renal Aguda (LRA) foram usados um modelo previamente validado em camundongos. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: Grupo Controle (CON; n=6), Grupo Nefropatia Induzida por AINEs (NEF n=8), Grupo N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC; n=6), Grupo *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro) 50 mg/Kg (M 50; n=12), Grupo *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro) 300 mg/kg (M 300; n=12) e Grupo *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro) 1000 mg/Kg (M 1000; n=6). Como estudos anteriores já apontaram a não indução de toxicidade aparente com as doses estipuladas em nossa investigação [17], não foi realizado o procedimento de DL50. Os camundongos dos grupos M 50, M 300 e M 1000, receberam a *Callycophyllum spruceanum* por meio de gavagem por 5 dias consecutivos.



**Figura 1.** Organograma resumido dos experimentos, representado pelos grupos e quantidades de animais utilizados (N). O Grupo (CON) se refere ao grupo CONTROLE, composto por animais saudáveis, em número de 6, tratados por gavagem com água destilada (AD), o qual não foi induzido com Diclofenaco de Sódio. A partir do Grupo NAC (N= 6 animais, tratamento com n-acetilcisteína 200mg/kg por via intraperitoneal) todos os grupos foram induzidos à nefropatia com Diclofenaco de sódio. O Grupo NEF (Nefropatia induzida, os animais foram um total de 8 e tratados (300 mg/Kg) com água destilada (AD) assim como no grupo (CON). Grupos M50, M300 e M1000 foram respectivamente tratados com a espécie estudada (Mulateiro) nas dosagens de 50mg/kg; 300mg/kg e 1000mg/kg. O número de animais tratados nesses grupos foram entre 6 a 12.

### 3.2.1 Obtenção dos extratos

#### a. Coleta e Identificação

O material botânico (casca de *Calycophyllum spruceanum*) foi coletado em área particular no município de Bujari - AC situada na BR 364 km 52 (-9.984004759277505, -67.33434478593384 (Coordenadas do endereço de coleta) [58]. Após coleta, exemplares da planta foram identificados e depositados no Herbário da UFAC sob o número 20307.



**Figura 2.** Fotografia da planta *Calycophyllum spruceanum* (Mulateiro), extraída da região Amazônica [53]

### 3.2.2 Secagem e Trituração e Extração

O material vegetal fresco foi seco em estufa a 45 °C e posteriormente triturado em moinho tipo lâmina, no Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos da UFAC (Universidade Federal do Acre). Em seguida, foi realizada a pesagem do material antes e após cada procedimento precedente à extração. Também foi feita a pesagem do extrato depois de liofilizado. O extrato hidroalcoólico da casca de *Calycophyllum spruceanum*, casca (EHCSC) foi elaborado através do método de percolação, no qual o material foi imerso em solvente extrator hidroalcoólico a 70%, com volume suficiente para cobrir o material vegetal, em recipiente fechado por 72 (setenta e duas) horas à temperatura ambiente. A cada 24 horas realizou-se a filtragem do extrato e novamente acrescido solvente ao material vegetal. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a 45°C, sendo ao final da evaporação liofilizado e mantido sob refrigeração [53].



**Figura 3.** Fotografia da planta *Calycophyllum spruceanum* (Mulateiro) triturado conforme pesquisa realizada no Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos da UFAC [53].

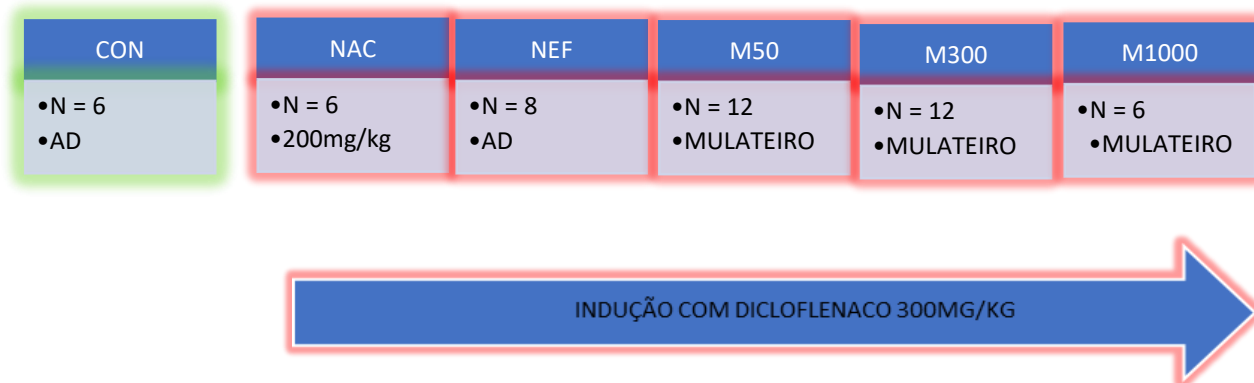
Os extratos de *Calycophyllum spruceanum* (Mulateiro) utilizados nos tratamentos foram diluídos na solução veículo (água destilada na proporção 0,1 mL de água destilada para 10g de peso vivo do animal).

Durante o mesmo período, os grupos CON e NEF receberam a solução veículo (de água destilada) por gavagem em substituição ao Mulateiro. O grupo NAC recebeu por via intraperitoneal (i.p.) N-acetilcisteína. Após o 5º dia, todos os grupos foram privados de água por 16h e a partir deste tempo foi induzida a nefropatia com o uso de Diclofenaco de sódico (AINE) (300 mg/kg i.p., dissolvido em solução salina).

Na data final do tratamento, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de tiopental (100mg/Kg). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca no ventrículo direito para dosagens bioquímicas, AOPP.







**Figura 4.** Organograma cronológico dos experimentos. Foram um total de 7 dias de experimento (D1-D7). Do dia 1 ao 5 (D1-D5): tratamento dos animais com solução AD por gavagem, N-acetilcisteína por via intraperitoneal ou Mulateiro via gavagem. No dia 5/6 (D5 e D6): representam os dias de indução da nefropatia por Diclofenaco de sódio; as caixas retangulares acima representam os grupos e respectivos N e concentrações de tratamentos realizados para cada grupo durante os 5 primeiros dias e a seta inferior a ordem cronológica sobre a indução da Nefropatia induzida por AINES até a eutanásia do animal (D7).

### 3.3 Análises Bioquímicas

O sangue coletado por meio de punção cardíaca foi imediatamente transferido para tubos de poliestireno contendo EDTA e homogeneizados por inversão vagarosa. Posteriormente foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm e o plasma coletado e armazenado a -20°C por 24h e a -80°C após as 24hs até a análise. As concentrações séricas de creatinina, uréia foram dosadas com seus respectivos kits e todas as medidas foram realizadas por métodos laboratoriais padronizados.



**Figura 5.** Fotografia da centrifugação do sangue coletado para preparação do plasma para realização das concentrações séricas de creatinina e ureia por métodos laboratoriais padronizados – UVV.

### **3.4 Preparação do homogenato renal para realização da AOPP e TBARS**

Após a eutanásia e perfusão com PBS, os rins foram pesados e colocados em tubos com 5x o seu peso de PBS. Para serem homogeneizados, os rins foram colocados em tubos específicos para a lise de células que contêm uma conta de cerâmica, que é agitada a 4 m/segundo durante 30 segundos (FastPrep-24 5G, MP Biomedicals), a fim de romper a membrana das células e expor 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.



**Figura 6.** Preparação do homogenato utilizando o Fastprep, em parceria com o Instituto Federal do Espírito Santo (IFES, Campus Vila Velha)

### **3.5 Avaliação do estresse oxidativo através dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP)**

Para a determinação dos níveis AOPP foram necessárias a diluição do plasma 1:1 e dos rins em 1:10 em PBS. Foram adicionadas em uma placa de 96 poços de fundo chato 40  $\mu$ L das amostras, 160 $\mu$ L de ácido cítrico anidro 0,20M e 10  $\mu$ L de iodeto de potássio (KI) 1,16M. Em seguida, agitada a placa manualmente durante 2 minutos e a leitura da absorbância e realizará em comprimento de onda de 340nm, em um leitor de microplacas (Spectra-Mas-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), contra o branco contendo 200  $\mu$ L de ácido cítrico anidro 0,20M e 10  $\mu$ L de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão realizada com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram expressos em  $\mu$ M de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

### **3.6 Determinação da peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica no plasma e nos rins foi mensurada através da reação de seus produtos com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Para isso, 43  $\mu\text{L}$  de amostra, tanto plasma quanto homogenato renal, reagiu com 77  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 7% em um tubo de poliestireno e foi centrifugada por 10 minutos à 3.500 rpm. Após os 10 minutos, 94  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi passado para outro tubo de poliestireno e adicionado 106  $\mu\text{l}$  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 foram pipetados em uma placa de 96 poços e a leitura realizada em leitor de ELISA (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).

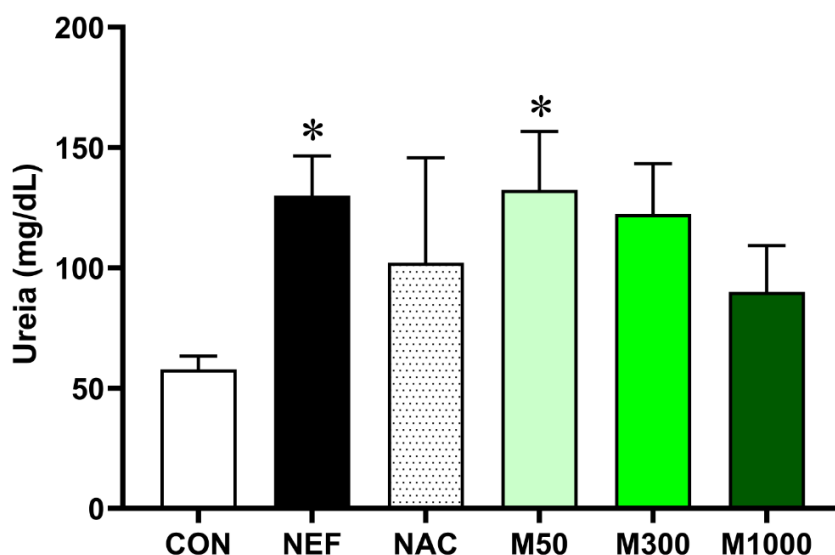
### **3.7 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). As médias dos valores comparando os diferentes grupos foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey. As diferenças serão consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 – Avaliação do efeito nefroprotetor do Mulateiro

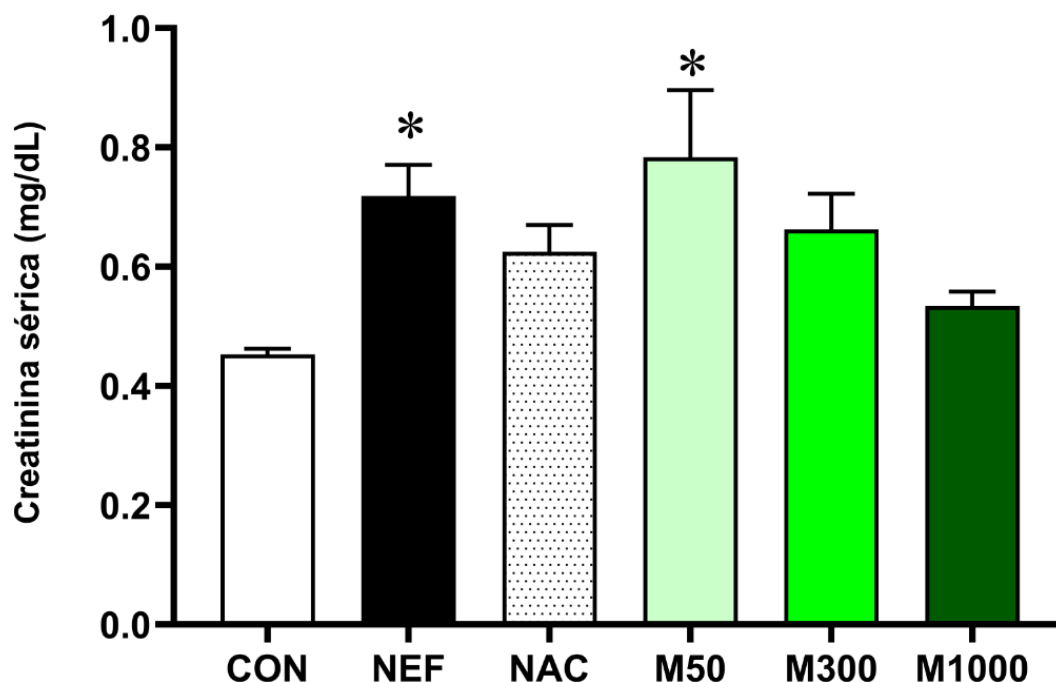
Assim como o proposto, foi observado que a nefropatia induzida por diclofenaco promoveu aumento nos valores da ureia plasmática no grupo NEF ( $130 \pm 18$ ,  $p < 0,05$ ), figura 7. O fato interessante é que o Mulateiro foi capaz de reduzir a uremia de uma forma dose-dependente apresentando um efeito preventivo apenas com a dose mais alta (M1000), com redução de cerca de 30% da ureia sérica ( $p > 0,05$  vs controle). Convém observar que na dose mais baixa (50 mg/Kg), a nefropatia ainda foi observada nesse grupo, com ureia com quase 2.5x o valor basal de ureia sérica ( $132$  vs  $57$  mg/dL,  $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Quantificação de ureia plasmática nos grupos experimentais. Os valores são expressos no gráfico de barras como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo com (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

Quanto ao outro biomarcador clássico de função renal, a figura 8 exhibe os valores de creatinina sérica, apresentando um comportamento de resultado semelhante ao obtido com a ureia sérica. Os grupos NEF apresentaram valores maiores de creatinina sérica quando comparados ao controle ( $0,72$  vs.  $0,45$  mg/dL,  $p < 0,05$ , respectivamente). De forma análoga, o tratamento com Mulateiro impediu o

aumento da creatinina em 25% somente apenas na maior dose (M1000,  $p > 0.05$  vs controle), e com a menor dosagem (M50) não impediu o aumento da creatinina (M50:  $0,78 \pm 0,11$ ; M300:  $0,66 \pm 0,06$  e M1000:  $0,53 \pm 0,05$  mg/dL,  $p < 0,05$ ).

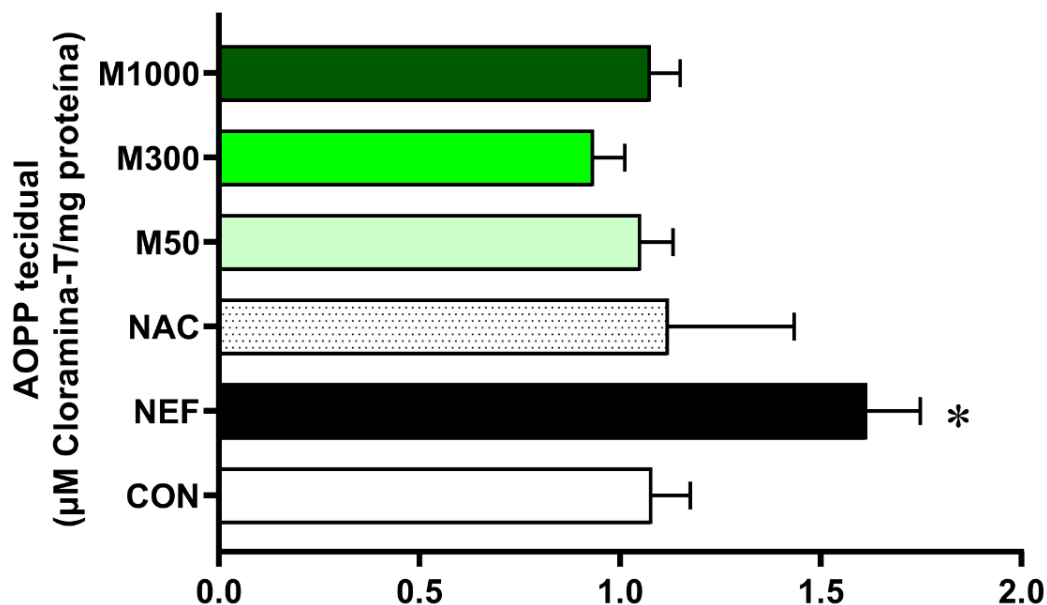


**Figura 8.** Quantificação de creatinina plasmática nos grupos experimentais. Gráfico de barras: os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

#### **4.2 – O Mulateiro previne o estresse oxidativo após a indução de nefropatia com Diclofenaco de sódio em camundongos suíço**

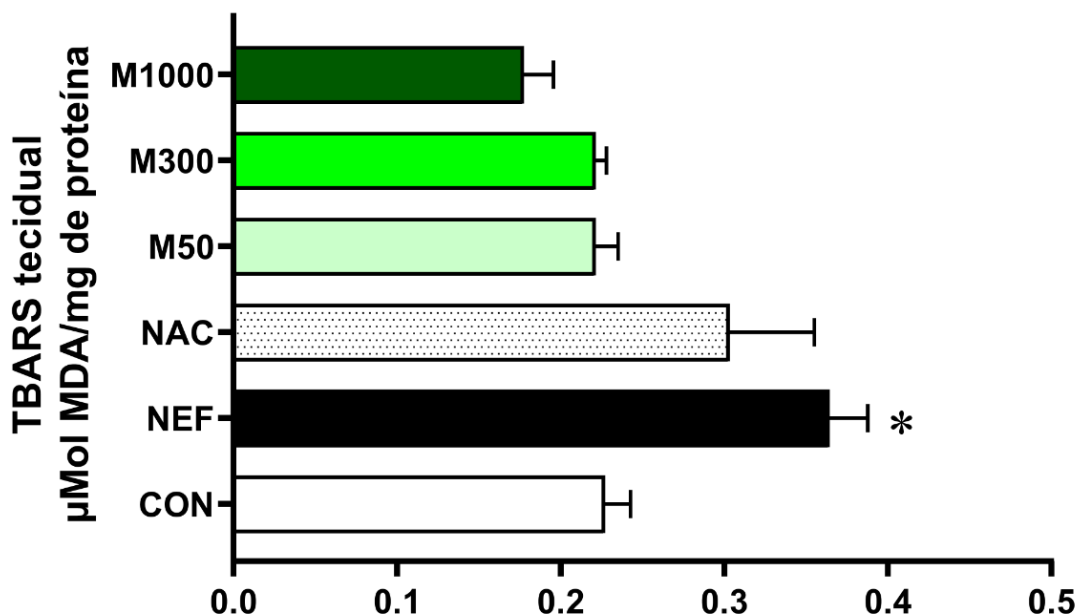
De acordo com a Figura 9, o grupo NEF apresentou incremento de proteínas oxidadas séricas em comparação ao grupo controle (NEF:  $1,6 \pm 0,13$  vs. CON:  $1,08 \pm 0,09$   $\mu\text{mol/mg}$  proteína,  $p < 0,05$ ). No entanto, o tratamento padrão com NAC e Mulateiro reduziram os níveis séricos de AOPP, em todas as doses estudadas, assim como o tratamento convencional com NAC. Portanto, em

relação à estratégia preventiva antioxidante aguda com Mulateiro, foi observado um efeito expressivo mesmo em doses mais baixas (50 mg/Kg) agudo antioxidante.



**Figura 9.** Quantificação da oxidação proteica no tecido renal (AOPP), que apenas o Mulateiro na dose mais alta mostra efeitos antioxidantes. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo CON e  $p < 0,05$  vs. grupo NEF (ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Tukey).

Observado a figura 10, podemos analisar um aumento de 63% da oxidação lipídica do grupo NEF em relação ao grupo controle (0,36 vs 0,22,  $p < 0,05$ , respectivamente). De maneira análoga ao observado com a oxidação proteica, foi observado que em todas as doses estudadas, o mulateiro foi capaz de prevenir a oxidação lipídica de animais submetidos à nefropatia por diclofenaco (M50:  $0,22 \pm 0,01$ ; M300:  $0,22 \pm 0,01$  e M1000:  $0,17 \pm 0,02$   $\mu\text{mol MDA/mg}$  de proteína,  $p > 0,05$  vs. controle).



**Figura 10** Análise de TBARS em grupos controle, Nefro e com Mulateiro induzido nefropatia com diclofenaco de sódio, observa-se um aumento nos níveis de stress oxidativo entre os animais do grupo Nefro (NEF) em relação ao grupo controle.

Além da observação de estresse oxidativo tecidual por oxidação proteica e lipídica, investigamos se o mulateiro também poderia refletir em redução do estresse oxidativo sérico. Curiosamente, esse extrato foi capaz de reduzir a oxidação lipídica de forma expressiva em todas as doses estudadas quando comparado ao grupo de nefropatia (M50:  $0,13 \pm 0,03$ ; M300:  $0,08 \pm 0,02$  e M1000:  $0,14 \pm 0,02$  µmol MDA/mg de proteína, vs. Nefropatia NEF:  $0,45 \pm 0,02$  µmol MDA/mg de proteína,  $p < 0,05$ ), assim como o tratamento convencional com NAC ( $0,14 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ).



## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos um possível papel nefroprotetor do extrato da espécie da *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), ricos em polifenóis, no contexto da nefropatia induzida por anti-inflamatórios com objetivo de obter dados que mostrem sua influência por diversos tipos de marcadores fisiológicos.

Devido ao seu importante efeito antioxidante e com estudos prévios *in vitro* e *in vivo* (com efeitos analgésicos, anti-inflamatórios) [53], a *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), é um produto vegetal atrativo para investigação, justificando a espécie escolhida. Seu potencial papel nefroprotetor associado ao seu já conhecido efeito anti-inflamatório, poderia explicar essa espécie como potencialmente interessante a ser explorada para tratamentos de inflamações crônicas tanto na área veterinária quanto em humanos.

Portanto, no modelo de nefropatia induzida por anti-inflamatórios (no caso o Diclofenaco de sódio), esta planta poderia ser um potencial substituto para promover efeito anti-inflamatório sem o risco de nefropatia, haja vista o uso indiscriminado de AINES no Brasil e a necessidade de busca por produtos vegetais que possam apresentar efeito nefroprotetor.

Através dos resultados inéditos obtidos, podemos considerar que em resposta aguda, o Mulateiro não apresenta um efeito nefroprotetor importante. Apesar da caracterização do efeito dose-dependente do Mulateiro, encontrar efeito nefroprotetor com o Mulateiro apenas na dose de 1000 mg/Kg podemos afirmar que um efeito pouco expressivo. A justificativa dessa observação está fundamentada nos estudos de Reagan-Shaw et al.,(2008), que através de cálculos de peso dos animais e área de superfície corpórea pode-se converter a dose de animais para humanos e vice-versa. A dose de 1000 mg/kg se convertida para humanos, conforme Shannon Reagan-Shaw et al., equivaleria a um consumo de 5,7 g/dia [54] de Mulateiro, o que seria considerado uma quantidade muito alta desse fitoterápico para ser administrada diariamente. E ainda que utilizássemos doses de 300mg/Kg, seria de 1.7g desse fitoterápico. Em suma, podemos afirmar que embora apresente eficácia como nefroprotetor, possui baixa potência (devido a elevada dose necessária para se observar efeito).

Quanto as propriedades antioxidantes do Mulateiro, em nosso estudo foi possível confirmar esse importante efeito em um modelo experimental de nefropatia, até mesmo em baixas doses do extrato. Fato interessante é que apesar da discreta ação nefroprotetora, a ação antioxidante foi marcante independentemente da dose utilizada. Assim como a ocorrência de elevada quantidade de flavonóides e conteúdos fenólicos, na planta de espécie de alta altitude *Skimmia anquetilia*, que apresentou fortes propriedades antioxidantes, levando a atividade hepatoprotetora e nefroprotetora [66].

Conforme a Figura 9, em relação à estratégia preventiva do Mulateiro, foi observado um efeito agudo antioxidante, provavelmente. Porém esse efeito antioxidante nem sempre está correlacionado com melhora funcional, pois filtração glomerular/secreção tubular não apresentou melhora, apesar do efeito antioxidante ser observado até na dose mais baixa (50 mg/Kg). Esses resultados contrastam com resultados observados por outras espécies recentemente investigadas pelo nosso grupo de pesquisa. Por exemplo, foi analisado o efeito nefroprotetor da Virola com a partir de 100 mg/Kg (10 x menos) [55]. Em outro estudo foi observado o efeito nefroprotetor da Silimarina a partir de 50 mg/Kg (20 x menos) [56].

A hipótese desse projeto foi que diante da ação antioxidante conhecida do extrato do Mulateiro, pudéssemos identificar um importante efeito nefroprotetor. Entretanto, não se apresentou expressivo. Assim como o mulateiro, temos um grupo que faz screening de diversos potenciais extratos vegetais. A *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), sendo especialmente escolhida, não apresentou portanto uma finalidade para promover a substituição do efeito anti-inflamatório sem risco de nefropatia. Por outro lado, não se descarta a proposta de explorar este extrato como um potente antioxidante renal em pacientes nefropatas ou que estejam sob uso de AINES.

Estudos sobre essa planta precisam ser mais aprofundados em diversos aspectos, quanto as suas indicações e utilização em potencial em tratamentos de uso crônicos para analisar uma possível diferença de parâmetros.

## 6. CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo demonstra pela primeira vez que o extrato vegetal do Mulateiro diminui o dano oxidativo sistêmico e renal preservando a função renal de forma dose-dependente (sendo apenas observado em doses elevadas de 1000 mg/Kg). Portanto, o Mulateiro pode ter aplicações clínicas promissoras contra a nefropatia induzida por diclofenaco mais pelas propriedades antioxidantes do que pela proteção da funcionalidade (*clearance*) renal.

## 7. REFERÊNCIAS

1. MELGAÇO S, SARIAVA MI, LIMA T, SILVA JÚNIOR G, DAHER E. NEFROTOXICIDADE DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS. RMRP. 30 DEZ. 2010
2. ONAY, O.S.; ERCOBAN, H.S.; BAYRAKCI, U.S.; MELEK, E.; CENGIZ, N.; BASKIN, E. ACUTE, REVERSIBLE NONOLIGURIC RENAL FAILURE IN TWO CHILDREN ASSOCIATED WITH ANALGESIC-ANTIPYRETIC DRUGS. PEDIATR. EMERG. CARE 2009, 25, 263-266.
3. EJAX P, BHOJANI K, JOSHI VR. NSAIDS AND KIDNEY. J ASSOCPHYSICIANS INDIA 2004; 52: 632-40.
4. WHELTON, A. NEPHROTOXICITY OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS: PHYSIOLOGICAL FOUNDATIONS AND CLINICAL IMPLICATIONS. AM. J. MED. 1999, 106, 13S-24S.
5. DUNN M. THE ROLE OF ARACHIDONIC ACID METABOLITES IN RENALHOMEOSTASIS: NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS, RENALFUNCTION AND BIOCHEMICAL, HISTOLOGICAL AND CLINICAL EFFECTSAND DRUG INTERACTIONS. DRUGS 1987; 33 (SUPPL L): 56-66.
6. GÓMEZ-ACEBO I., DIERSSEN-SOTOS T., DE PEDRO M., PÉREZ-GÓMEZ B., CASTAÑO-VINYALS G., FERNÁNDEZ-VILLA T., PALAZUELOS-CALDERÓN C., AMIANO P., ETXEBERRIA J., BENAVENTE Y., FERNÁNDEZ-TARDÓN G., SALCEDO-BELLIDO I., CAPELO R., PEIRÓ R., MARCOS-GRAGERA R., HUERTA J.M., TARDÓN A., BARRICARTE A., ALTZIBAR J.M., ALONSO-MOLERO J., DÁVILA-BATISTA V., ARAGONÉS N., POLLÁN M., KOGEVINAS M., LLORCA J. EPIDEMIOLOGY OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS CONSUMPTION IN SPAIN. THE MCC-SPAIN STUDY. BMC PUBLIC HEALTH. 2018 SEP 21;18(1):1134. DOI: 10.1186/S12889-018-6019-Z. PMID: 30241493; PMCID: PMC6150967.
7. ANWAR M.M., LAILA I.M.I.. MITIGATIVE EFFECT OF CAFFEINE AGAINST DICLOFENAC-INDUCED HEPATO-RENAL DAMAGE AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN MALE ALBINO RATS. BMC COMPLEMENT MED THER. 2022 DEC 8;22(1):327. DOI: 10.1186/S12906-022-03802-Y. PMID: 36482339; PMCID: PMC9732991.

8. SHAFEEK F., ABU-ELSAAD N., EL-KAREF A., IBRAHIM T.. GUM ACACIA MITIGATES DICLOFENAC NEPHROTOXICITY BY TARGETING MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, COMPLEMENT RECEPTOR-1 AND PRO-APOPTOTIC PATHWAYS. *FOOD CHEM TOXICOL.* 2019 JUL;129:162-168. DOI: 10.1016/J.FCT.2019.04.050. EPUB 2019 APR 28. PMID: 31042592.
9. UNGPRASERT, P. CHEUNGPASITPORN, W. CROWSON, C.S. MATTESON, E.L. INDIVIDUAL NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS AND RISK OF ACUTE KIDNEY INJURY: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF OBSERVATIONAL STUDIES, *EUR. J. INTERN. MED.* 26 (2015) 285–291.
10. LEONARD, C.E. FREEMAN, C.P. NEWCOMB, C.W. REESE, P.P. HERLIM, M. BILKER, W.B. HENNESSY, S. STROM, B.L. PROTON PUMP INHIBITORS AND TRADITIONAL NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS AND THE RISK OF ACUTE INTERSTITIAL NEPHRITIS AND ACUTE KIDNEY INJURY, *PHARMACOEPIDEMIOLOG. DRUG SAF.* 21 (2012) 1155–1172.
11. WEHLING M. NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS USE IN CHRONIC PAIN CONDITIONS WITH SPECIAL EMPHASIS ON THE ELDERLY AND PATIENTS WITH RELEVANT COMORBIDITIES: MANAGEMENT AND MITIGATION OF RISKS AND ADVERSE EFFECTS. *EUR J CLIN PHARMACOL* 2014;70:1159-72.
12. RANDY L., PHDMARK A. P. NSAIDS: ACUTE KIDNEY INJURY JAN 2024. THIS TOPIC LAST UPDATED: ERIC N TAYLOR, MD, MSC, FASN JAN 18, 2023.
13. ZHANG X., DONNAN P.T., BELL S., GUTHRIE B. NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY IN THE COMMUNITY DWELLING GENERAL POPULATION AND PEOPLE WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *BMC NEPHROL* 2017;18:256.
14. KIM S, JOO K.W. ELECTROLYTE AND ACID-BASE DISTURBANCES ASSOCIATED WITH NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS. *ELECTROLYTE BLOOD PRESS* 2007;5:116-25
16. GHANE SHAHRBAF F, ASSADI F.
15. KUMMER C.L., COELHO T.C.R.B. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES INIBIDORES DA CICLOOXIGENASE-2 (COX-2): ASPECTOS

ATUAIS; REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA. VOL. 52, Nº4, CAMPINAS JULY/AUG, 2002.

16. PHADKE, V. BHARDWAJ, S. SAHOO, B. KANHERE, S. MATERNAL INGESTION OF DICLOFENAC LEADING TO RENAL FAILURE IN NEWBORNS, PEDIATR. NEPHROL. 27 (2012) 1033–1036.

17. GALESIC, K. LJUBANOVIC, D. BULIMBASIC, S. RACIC, I. MINIMAL CHANGE DISEASE AND ACUTE TUBULAR NECROSIS CAUSED BY DICLOFENAC, NEPHROLOGY (CARLTON) 13 (2008) 87–88.

18. ROSSI, E. FERRACCIOLI, G.F. CAVALIERI, F. MENTA, R. DALL'AGLIO, L. MIGONE, P.P. DICLOFENAC-ASSOCIATED ACUTE RENAL FAILURE, NEPHRON 40 (1985) 491–493.

19. FATTORI, V. BORGHI, S.M. GUAZELLI, C.F.S. GIROLDO, A.C. CRESPIGIO, J. BUSSMANN, A.J.C. COELHO-SILVA, L. LUDWIG, N.G. MAZZUCO, T.L. CASAGRANDE, R. VERRI, W.A. VINPOCETINE REDUCES DICLOFENAC-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY THROUGH INHIBITION OF OXIDATIVE STRESS, APOPTOSIS, CYTOKINE PRODUCTION, AND NF-KB ACTIVATION IN MICE, PHARMACOL. RES. 120 (2017) 10–22.

20. NG, L.E. VINCENT, A.S. HALLIWELL, B. WONG, K.P. ACTION OF DICLOFENAC ON KIDNEY MITOCHONDRIA AND CELLS, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 348 (2006) 494–500, S.M. BORGHI ET AL. LIFE SCIENCES 208 (2018) 221–231 229.

21. ALMEIDA M.C. 2003. ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MULATEIRO (CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM BENTH) - RUBIACEAE - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. DISPONÍVEL EM [HTTP:// WWW.BIBLIOTECA.UNESP.BR](http://www.biblioteca.unesp.br). ACESSO EM 24 DE OUTUBRO DE 2006

22. CAETANO, R.S. ET AL. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS POR FREQUENTADORES DOS AMBULATÓRIOS SANTA MARCELINA, RO. REVISTA SAÚDE E PESQUISA, V. 7, N. 1, P. 55-63, 2014.

23. REVILLA, J. PLANTAS DA AMAZÔNIA: OPORTUNIDADES ECONÔMICAS E SUSTENTÁVEIS. 1.ED. MANAUS: SEBRAE/ INPA, 2001. 405P.

24. RIZZINI, C.T. ÁRVORES E MADEIRAS ÚTEIS NO BRASIL: MANUAL DE DENDROLOGIA BRASILEIRA. 1.ED. SÃO PAULO: BLÜCHER.1971. 292P.

25. LUNN, K. F. THE KIDNEY IN CRITICALLY ILL SMALL ANIMALS. VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA SMALL ANIMAL PRACTICE, PHILADELPHIA, V. 41, P. 727-744, 2011.
26. ROSS, E. A. CONGESTIVE RENAL FAILURE: THE PATHOPHYSIOLOGY AND TREATMENT OF RENAL VENOUS HYPERTENSION. JOURNAL OF CARDIAC FAILURE, WASHINGTON, V. 18, N. 12, P. 930-938, 2012.
27. JOHN, R.; HERZENBERG, A. M. RENAL TOXICITY OF THERAPEUTIC DRUGS. JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, LONDON, V. 62, P. 505-515, 2009.
28. MENEZES, L. B.; FIORAVANTI, M. C. S.; SILVA, M. S. B.; FRANCO, L. G.; SALES, T. P.; ANDRASCKO, M. M.; VEADO, J. C. V.; ARAÚJO, E. G. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CLORPROMAZINA SOBRE A FUNÇÃO RENAL DE CÃES SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO. PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, RIO DE JANEIRO, V. 30, N. 2, P. 108- 114, 2010.
29. ROSS, L. ACUTE KIDNEY INJURY IN DOGS AND CATS. VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA SMALL ANIMAL PRACTICE, PHILADELPHIA, V. 41, P. 1–14, 2011. 49.
30. GOBE, G. C.; JOHNSON, D. W. DISTAL TUBULAR EPITHELIAL CELLS OF THE KIDNEY: POTENTIAL SUPPORT FOR PROXIMAL TUBULAR CELL SURVIVAL AFTER RENAL INJURY. THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY, EXETER, V. 39, P. 1551– 1561, 2007.
31. CLARKSON, M.; GIBLIN, L.; O'CONNELL, F.; KELLY, P.; WALSH, J.; CONLON, P.; O'MEARA, Y.; DORMON, A.; CAMPBELL, E.; DONOHUE, J. ACUTE INTERSTITIAL NEPHRITIS: CLINICAL FEATURES AND RESPONSE TO CORTICOSTEROID THERAPY. NEPHROL. DIAL. TRANSPLANT. 2004, 19, 2778-2783.
32. MUSU M., FINCO G., ANTONUCCI R., POLATI E., SANNA D., EVANGELISTA M., ET AL. ACUTE NEPHROTOXICITY OF NSAID FROM THE FOETUS TO THE ADULT. EUR REV MED PHARMACOL SCI 2011;15:1461-72.
33. CHIU H.Y., HUANG H.L., LI C.H., CHEN H.A., YEH C.L., CHIU S.H., ET AL. INCREASED RISK OF CHRONIC KIDNEY DISEASE IN RHEUMATOID ARTHRITIS ASSOCIATED WITH CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS—A NATIONAL POPULATION-BASED COHORT STUDY. PLOS ONE 2015;10:E0136508.

34. SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M .C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. PLANTAS MEDICINAIS E SEUS CONSTITUINTES BIOATIVOS: UMA REVISÃO DA BIOATIVIDADE E POTENCIAIS BENEFÍCIOS NOS DISTÚRBIOS DA ANSIEDADE EM MODELOS ANIMAIS. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 18, N. 4, P. 642- 654. 2008.
35. CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. SITUAÇÃO DO REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS NO BRASIL. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 18, N. 2, P. 314-319, 2008.
36. CHEIKHYOUSSEF, A.; SHAPI, M.; MATENGU, K.; ASHEKELLE, H. M. ETHNOBOTANICAL STUDY OF INDIGENOUS KNOWLEDGE ON MEDICAL PLANT USE BY TRADITIONAL HEALERS IN OSHIKOTO REGION, NAMIBIA. JOURNAL OF ETHNOBIOLOGY AND ETNOMEDICINE, V. 7, N.10, P. 1-11, 2011.
37. USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. PLANTAS MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NO MERCADO MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE-MS. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 19, N. 3, P. 805-813, 2009.
38. OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; ARQMO; LEITÃO, S. G. ETHNOPHARMACOLOGICAL VERSUS RANDOM PLANT SELECTION METHODS FOR THE EVALUATION OF THE ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 21, N. 5, P. 793-806, 2011B.
39. NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; CARTÁGENES, M. S. S.; COUTINHO-MORAES, D. F.; AMARAL, F. M. M. PLANT SPECIES USED IN GIARDIASIS TREATMENT: ETHNOPHARMACOLOGY AND IN VITRO EVALUATION OF ANTI-GIARDIA ACTIVITY. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 24, N. 2, P. 215-224, 2014.
40. NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; CARTÁGENES, M. S. S.; COUTINHO-MORAES, D. F.; AMARAL, F. M. M. PLANT SPECIES USED IN GIARDIASIS TREATMENT: ETHNOPHARMACOLOGY AND IN VITRO EVALUATION OF ANTI-GIARDIA ACTIVITY. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 24, N. 2, P. 215-224, 2014.



41. PONTE, E. L. DA. EFEITO ANTI - INFLAMATÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CROTON ZEHNTNERI PAX ET HOFMM E DO ANETOL. FORTALEZA, 2009. 91F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
42. PETROVICK PR., GONZÁLEZ ORTEGA G., BASSANI VL. 1997. DE PLANTA MEDICINAL A FORMA FARMACÊUTICA. UM CAMINHO (AINDA) LONGO PARA AS PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS. REV CIEN CULT 49: 364-369.
43. RECORD, S.J.; HESS, R.W. TIMBERS OF THE NEW WORLD. 1.ED. NEW HAVEN: YALE UNIVERSITY PRESS, 1943. 643P.
44. RIZZINI, C.T. ÁRVORES E MADEIRAS ÚTEIS NO BRASIL: MANUAL DE DENDROLOGIA BRASILEIRA. 1.ED. SÃO PAULO: BLÜCHER.1971. 292P.
45. GUITTON, T.L. MADEIRAS DA AMAZÔNIA: CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO. 1.ED., RIO BRANCO: CEAGAC, 1991. 138 P.
46. DUCKE, A.; BLACK, E.A. NOTAS SOBRE FILOGEOGRAFIA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. BOLETIM TÉCNICO DO INSTITUTO AGRONÔMICO DO NORTE, V.29, [S.N.], P. 62, 1954.
47. ALMEIDA M.C. 2003. ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MULATEIRO (CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM BENTH) - RUBIACEAE - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. DISPONÍVEL EM [HTTP:// WWW.BIBLIOTECA.UNESP.BR](http://www.biblioteca.unesp.br). ACESSO EM 24 DE OUTUBRO DE 2006
48. CAETANO, R.S. ET AL. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS POR FREQUENTADORES DOS AMBULATÓRIOS SANTA MARCELINA, RO. REVISTA SAÚDE E PESQUISA, V. 7, N. 1, P. 55-63, 2014.
49. REVILLA, J. PLANTAS DA AMAZÔNIA: OPORTUNIDADES ECONÔMICAS E SUSTENTÁVEIS. 1.ED. MANAUS: SEBRAE/ INPA, 2001. 405P.
50. ARAÚJO, V.F. ET AL. MULATEIRO. IN: PASTORE JÚNIOR, F. ET AL. PLANTAS DA AMAZÔNIA PARA A PRODUÇÃO COSMÉTICA. 1.ED. BRASÍLIA: EDITORA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2007, P. 42-44.
51. LINO, T.S.S. ET AL. EFEITO ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DA CASCA DO CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM. IN: REUNIÃO ANUAL DA SBPC - SOCIEDADE BRASILEIRA

PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 61., 2009, MANAUS. ANAIS ELETRÔNICOS. MANAUS: UFAM, 2009.

52. MORAIS, S.M. ET AL. AÇÃO ANTIOXIDANTE DE CHÁS E CONDIMENTOS DE GRANDE CONSUMO NO BRASIL. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 19, N. 1, P. 315-320, 2009.

53. SILVA, A. P. A. B. DA ET AL. CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM BENTH AMELIORATES ACUTE INFLAMMATION IN MICE. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, LIMERICK, V. 219, P. 103-109, JUN. 2018.

54. REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., AHMAD, N., 2008. DOSE TRANSLATION FROM ANIMAL TO HUMAN STUDIES REVISITED. FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY 22, 659–61.

55. BOA, I. S. F.; PORTO, M. L.; PEREIRA, A. C. H.; RAMOS, J. P. L. *ET AL.* RESIN FROM VIOLA OLEIFERA PROTECTS AGAINST RADIOCONTRAST-INDUCED NEPHROPATHY IN MICE. PLOS ONE, 10, N. 12, DEC 2015.

56. SANTOS, V. D. S., & SANTOS, V. D. S. (2018). EFEITO NEFROPROTETOR DA SILIMARINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À NEFROPATIA POR CONTRASTE.

57. GOMES S.M., CHAVES V.M., DE CARVALHO A.M., DA SILVA E.B., DE MENEZES NETO E.J., DE FARIAS MOURA G., DA SILVA CHAVES L., ALVES RRN, DE ALBUQUERQUE U.P., DE OLIVEIRA PEREIRA F., JACOB M.C.M. BIODIVERSITY IS OVERLOOKED IN THE DIETS OF DIFFERENT SOCIAL GROUPS IN BRAZIL. SCI REP. 2023 MAY 9;13(1):7509.

58. [HTTPS://WWW.GOOGLE.COM/MAPS/DIR/"/-10.0571698,-67.3278507/@-10.2368221,68.5400942,219398M/DATA=!3M1!1E3!4M9!4M8!1M5!1M1!1S0X93D5590A3DFD4D4F:0X64659061E2F150F5!2M2!1D-67.338837!2D-10.0598742!1M0!3E3?ENTRY=TTU](https://www.google.com/maps/dir/)

60. ANWAR M.M., LAILA I.M.I.. MITIGATIVE EFFECT OF CAFFEINE AGAINST DICLOFENAC-INDUCED HEPATO-RENAL DAMAGE AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN MALE ALBINO RATS. BMC COMPLEMENT MED THER. 2022 DEC 8;22(1):327. DOI: 10.1186/S12906-022-03802-Y. PMID: 36482339; PMCID: PMC9732991.

61. SHAFEEK F., ABU-ELSAAD N., EL-KAREF A., IBRAHIM T.. GUM ACACIA MITIGATES DICLOFENAC NEPHROTOXICITY BY TARGETING MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1, COMPLEMENT RECEPTOR-1 AND PRO-APOPTOTIC PATHWAYS. FOOD CHEM TOXICOL. 2019 JUL;129:162-168. DOI: 10.1016/J.FCT.2019.04.050. EPUB 2019 APR 28. PMID: 31042592.
62. RANDY L., PHDMARK A. P. NSAIDS: ACUTE KIDNEY INJURY JAN 2024. THIS TOPIC LAST UPDATED: ERIC N TAYLOR, MD, MSC, FASN JAN 18, 2023.
63. PEIXOTO H., ROXO M., KOOLEN H., DA SILVA F., SILVA E., BRAUN M..S, WANG X., WINK M. CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM (BENTH.), THE AMAZONIAN "TREE OF YOUTH" PROLONGS LONGEVITY AND ENHANCES STRESS RESISTANCE IN CAENORHABDITIS ELEGANS. MOLECULES. 2018 FEB 27;23(3):534. DOI: 10.3390/MOLECULES23030534. PMID: 29495517; PMCID: PMC6017494.
64. DA SILVA A.P.A.B., AMORIM R.M.F., DE FREITAS LOPES R., MOTA M.R.L., DA SILVA F.M.A., KOOLEN H.H.F., LIMA E.S., ASSREUY A.M.S., DA CUNHA R.M. CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM BENTH AMELIORATES ACUTE INFLAMMATION IN MICE. J ETHNOPHARMACOL. 2018 JUN 12;219:103-109. DOI: 10.1016/J.JEP.2018.03.023. EPUB 2018 MAR 19. PMID: 29567276.
65. MELO, N. C. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA SOLAR IN VITRO DAS ESPÉCIES PAU-MULATO (CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM (BENTH.) HOOK. F. EX K. SCHUM) E IPÊ-AMARELO (TABEBUIA AUREA (SILVA MANSO) BENTH. & HOOK. F. EX S. MOORE). MACAPÁ, 2015. 90F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ.
66. KUKRETI N., CHITME H.R., VARSHNEY V.K., ABDEL-WAHAB B.A., KHATEEB M.M., HABEEB M.S. ANTIOXIDANT PROPERTIES MEDIATE NEPHROPROTECTIVE AND HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND HYDRO-ALCOHOLIC EXTRACT OF THE HIGH-ALTITUDE PLANT *SKIMMIA ANQUETILIA*. ANTIOXIDANTS (BASEL). 2023 MAY 28;12(6):1167. DOI: 10.3390/ANTIOX12061167. PMID: 37371897; PMCID: PMC10295467

