

UNIVERSIDADE VILA VELHA - UVV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MACELA (*Achyrocline satureioides* LAM.) PREVINE NEFROPATIA
INDUZIDA POR CONTRASTE EM CAMUNDONGOS**

KETHELEY LEPAUS GUSS

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - UVV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MACELA (*Achyrocline satureioides* LAM.) PREVINE NEFROPATIA
INDUZIDA POR CONTRASTE EM CAMUNDONGOS**

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

KETHELEY LEPAUS GUSS

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

G982m	Guss, Ketheley Lepaus. Macela (<i>Achyrocline satureioides</i> Lam.) previne nefropatia induzida por contraste em camundongos / Ketheley Lepaus Guss – 2016. 24 f.: il. Orientador: Rodrigo Scherer. Co-orientador: Thiago de Mello Costa Pereira. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2016. Inclui bibliografias. 1. Farmacologia e terapêutica. 2. Nefropatia. 3. Rins – Doença. I. Scherer, Rodrigo. II. Pereira, Thiago de Mello Costa. III. Universidade Vila Velha. IV. Título. CDD 615
-------	--

KETHELEY LEPAUS GUSS

**MACELA (*Achyrocline satureioides* LAM.) PREVINE NEFROPATIA INDUZIDA
POR CONTRASTE EM CAMUNDONGOS**

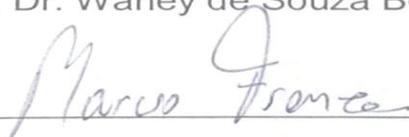
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Warley de Souza Borges (UFES)



Prof. Dr. Márcio Fronza (UVV)



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade (UVV)



Prof. Dr. Rodrigo Scherer (UVV)

Orientador

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade concedida e por ter me sustentado em todos os momentos e circunstâncias difíceis onde só Ele me traria solução. Obrigada Senhor, porque Tu és Bondoso, Misericordioso e porque me amas tanto. Eu o louvo e bendigo, Tu és o meu Deus.

À CAPES pela Bolsa de mestrado e à FAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, por me amarem, me educarem e me apoiarem em tudo na minha vida. Com certeza eu ouvi e segui o quanto vocês almejavam meu bem e meu futuro, me incentivando a sempre buscar mais conhecimento e crescimento, e me proporcionaram isso, dentro das nossas condições. Amo vocês, devo tudo à vocês!

Ao meu esposo, amor da minha vida, que esteve ao meu lado sempre, me apoiando e incentivando o meu crescimento acadêmico e profissional. E nos momentos mais difíceis foi meu porto seguro, meu companheiro, amigo, amante. Obrigada amor, você foi muito importante nesta fase da minha vida. Te agradeço por tudo!

Ao meu mestre orientador Rodrigo, por ter me dado a oportunidade e confiado a mim a responsabilidade de trabalhar com a Macela. Obrigada pelos ensinamentos que me ajudaram a desenvolver um pouco da arte da pesquisa, que até então não me era tão familiar e a qual me apaixonei. Agradeço pelos vários "puxões de orelha", que, tenha certeza, foram doídos mas valeram à pena, pois me impulsionavam a querer ser e fazer melhor. Obrigada professor!

Agradeço à vida dos meus irmãos (Kemily e Bruno) e sobrinhos (Kauã, Ana Luiza e Maria Clara), que eu amo muito e os quais foram minha inspiração para nunca desistir e querer me tornar uma pessoa melhor (irmã e titia). Aos primo(as) e tios(as) que torceram por mim e me apoiaram na minha jornada. À minha vizinha, que não está mais entre nós, mas que me amou e cuidou como filha - como queria vó, ter tido mais tempo para cuidar da senhora...

Aos meus amigos, que me ajudaram mesmo sem saber, me aconselhando ou consolando e incentivando: Cacá, Fernanda, Laís, Dri. Aos IC's, Lucas, Bruno que não mediram esforços para me ajudar a obter os resultados *in vivo* e, em especial ao Stéfano, que esteve comigo em quase todos os momentos, desde o início do trabalho, foi meu braço direito e um grande amigo com quem podia contar sempre.

Esses anos de mestrado teriam sido bem mais difíceis se não fossem todos vocês!
Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 Materiais	16
2.2 Amostra	16
2.3 Extração	16
2.4 Compostos Fenólicos Totais	17
2.5 Flavonoides Totais	17
2.6 Quantificação de quercetina por CLAE-EM/EM	18
2.7 Atividade antioxidante	18
2.7.1 Método DPPH	18
2.7.2 Método ABTS	19
2.7.2 Método FRAP	20
2.8 Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora	20
2.8.1 Tratamento e indução de nefropatia por contraste	20
2.8.2 Análise bioquímica de uréia e creatinina sérica	21
2.8.3 Produtos de oxidação proteica (AOPP)	21
2.8.4 Microscopia por varredura (MEV)	22
2.9 Análise estatística	22
3 RESULTADOS	23
3.1 Rendimento de extração, teor de fenólicos, flavonoides totais e quercetina	23
3.2 Atividade Antioxidante	23

3.3 Resultados "in vivo"	24
3.3.1 Análise de creatinina e ureia	24
3.3.2 Produtos de oxidação proteica (AOPP)	25
3.3.3 Microscopia por varredura (MEV)	26
4 DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÃO	30
6 REFERÊNCIAS	31

LISTA DE FIGURAS

Níveis séricos de ureia e creatinina nos grupos: C (controle); NIC (nefropatia induzida por contraste); NAC (nefropatia induzida por contraste + N-acetilcisteína 200 mg/kg); Q (nefropatia induzida por contraste + quercetina mg/kg); M 10 (nefropatia induzida por contraste + macela 10 mg/kg); e M50 (nefropatia induzida por contraste + macela 50 mg/kg).

24

Níveis de produtos avançados de oxidação protéica nos grupos: C (controle); NIC (nefropatia induzida por contraste); NAC (nefropatia induzida por contraste + N-acetilcisteína 200 mg/kg); Q (nefropatia induzida por contraste + quercetina 10 mg/kg); M 10 (nefropatia induzida por contraste + macela 10 mg/kg); e M50 (nefropatia induzida por contraste + macela 50 mg/kg). Letras diferentes correspondem a diferença significativa ($p < 0,05$).

26

Microscopia eletrônica de varredura ilustrando glomérulos (A-F), podócitos (G-L) e túbulos renais (M-R). C (controle); NIC (nefropatia induzida por contraste); NAC (nefropatia induzida por contraste + N-acetilcisteína 200 mg/kg); Q (nefropatia induzida por contraste + quercetina 10 mg/kg); M 10 (nefropatia induzida por contraste + macela 10 mg/kg); e M50 (nefropatia induzida por contraste + macela 50mg/kg).

27

LISTA DE TABELAS

- 1 Determinação do rendimento total de extração, teor de fenólicos totais, flavonoides totais e quercetina nos extratos etanólicos de *A. saturoioides*. 23
- 2 Atividade antioxidante dos extratos de *Achyrocline saturoioides* pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. 24

LISTA DE ABREVIATURAS

AOPP - Produtos avançados de oxidação proteica

CLAE-EM/EM - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

IR₅₀ - concentração que reduz 50% dos radicais livres

L-NAME - Inibidor da óxido nítrico sintase

M10 - nefropatia induzida por contraste + Solução de extrato de Macela na dosagem 10 mg/kg

M50 - nefropatia induzida por contraste + Solução de extrato de Macela na dosagem 50 mg/kg

M80% - Maceração com etanol à 80%

M100% - Maceração com etanol absoluto (aqui representado por 100%)

NIC - Nefropatia induzida por contraste

NAC - N-Acetilcisteína

PBS - Tampão fosfato-salino

Q - Quercetina

SAOS - Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono

STZ - Estreptozotocina

U80% - Maceração assistida por ultrassom com etanol à 80%

U100% - Maceração assistida por ultrassom com etanol absoluto (aqui representado por 100%)

RESUMO

GUSS, Ketheley Lepaus, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, fevereiro de 2016. **Macela (*Achyrocline satureioides* Lam.) previne nefropatia induzida por contraste em camundongos.** Orientador: Rodrigo Scherer. Co-orientador: Thiago de Mello Costa Pereira.

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é uma das principais causas de insuficiência renal adquirida em meio hospitalar. A NIC se caracteriza por uma deficiência na filtração glomerular devido a desordens oxidativas. Não existe tratamento específico para NIC, a prevenção é a melhor forma de lidar com essa doença iatrogênica. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação preventiva de extratos de *Achyrocline satureioides* - conhecida como Macela- e da quercetina contra a NIC em camundongos. Foram avaliadas a atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), o teor de compostos fenólicos (método Folin-Ciocalteu) e de flavonoides totais (reação com cloreto de alumínio), e o teor de quercetina (LC-MS/MS) presentes nos extratos obtidos por diferentes métodos. Foram utilizados 36 camundongos divididos em 6 grupos com dose oral durante 5 dias: grupo Controle (C), grupo Nefropatia Induzida por Contraste (NIC); grupo N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC); grupo quercetina 10 mg/kg (Q); grupo Macela 10 mg/Kg (M10); e Grupo Macela 50 mg/Kg (M50). Foram avaliados os níveis séricos de ureia e creatinina, produtos avançados de oxidação proteica e a ultraestrutura renal através de microscopia eletrônica por varredura. O extrato U100% (maceração assistida por ultrassom com etanol 100%), apresentou significativamente maior atividade antioxidante e maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides, incluindo quercetina. Os resultados mostraram que o grupo M10 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo C, inclusive com resultados significativamente melhores que os grupos NAC e Q na proteção contra disfunção renal causada por NIC, mostrando que o efeito sinérgico entre os compostos do extrato pode ser um medicamento promissor para prevenir essa doença.

PALAVRAS-CHAVES: *Achyrocline satureioides*, Macela, Marcela, nefropatia, contraste, fenólicos.

ABSTRACT

GUSS, Ketheley Lepaus, M.Sc., University of Vila Velha - ES, February 2016.
Macela (*Achyrocline satureioides* Lam.) prevents contrast-induced nephropathy in mice. Advisor: Rodrigo Scherer. Co-supervisor: Thiago de Mello Costa Pereira.

The Contrast-induced nephropathy (CIN) it is a main cause of hospital-acquired acute renal failure. The CIN is characterized by a deficiency in glomerular filtration rate dueto oxidative disorders. There is no specific treatment for CIN, prevention is the best way to deal with this iatrogenic disease. The aim of this study was to evaluate the preventive action *Achyrocline satureioides* extracts -known as Macela- and quercetin against CIN in mice. Were evaluated antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP), the phenolic compound content (Folin-Ciocalteu method) and total flavonoid (reaction with aluminum chloride), and quercetin content (LC-MS/MS) present in extracts obtained by different methods. Were used 36 mice divided in to 6 groups with oral dose for 5 days: control group (C) Contrast-induced nephropathy group (CIN); the N-acetylcysteine 200 mg / kg (NAC); quercetin group 10 mg/kg (Q); Macela group10 mg/kg (M10); Macela group and 50 mg/kg (M50). Were evaluated the serum levels of urea and creatinine, protein oxidation products, collagen contentand renal ultra structure using scanning microscopy. The U100% extract (maceration assisted by ultrasound with 100% ethanol), had significantly higher antioxidant activity and higher levels of phenolics and flavonoids including quercetin. The results showed that the M10 group showed no significant difference in relation to group C, including significantly better results than the NAC and Q groups in protection against renal dysfunction caused by CIN, showing that the synergistic effect between the compounds of the extract can be a promising drug for preventing this disease.

Key words: *Achyrocline satureioides*, Macela, Marcela, nephropathy, contrast, phenolics.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o perfil de saúde populacional, índices crescentes de pacientes mais velhos com comorbidades associadas como diabetes, insuficiência cardíaca e insuficiência renal, necessitam de procedimentos de diagnóstico e intervenção que utilizam meios de contraste iodados intravenosos. Isto representa uma das principais causas de nefropatia por contraste (Bartorelli e Marenzi, 2008) e, apesar do uso de meios de contraste iodados ser essencial em várias técnicas de diagnósticos por imagens, ainda não existem estratégias preventivas suficientes (Andreucci et al., 2014).

A nefropatia induzida por contraste (NIC) é definida como uma diminuição da função renal, caracterizada por um aumento da creatinina no plasma superior a 25% ou de 0,5 mg/dL acima do valor basal, até 3 dias após a administração intravascular do meio de contraste (Assareh et al., 2016). Existem três tipos de meios de contraste: os de primeira geração ou de alta osmolaridade (1400 a 1800 mOsm/Kg) por exemplo o Diatrizoato; os de segunda geração ou de baixa osmolaridade (500 a 850 mOsm/Kg) que possuem uma osmolaridade superior à do plasma, como o Iohexol (Omnipaque®), o Iopamidol (Isovue®), o Ioxilan (Oxilan®), a Iopramida (Ultravist®), o Ioversol (Optiray®); e os contrastes mais recentes são iso-osmolares (290 mOsm/Kg). Estes possuem a mesma osmolaridade do plasma, um exemplo é o Iodixanol (Visipaque®) (Seeliger et al., 2012; Santos et al., 2011).

Os mecanismos principais que envolvem a patogênese da nefropatia por contraste são: a vasoconstrição renal, redução da perfusão renal, que levam à hipóxia medular, e os efeitos citotóxicos diretos dos meios de contraste, causando danos às células tubulares e a ativação de mediadores inflamatórios (Mohammed et al., 2013). Além disso, modelos animais sugerem uma diminuição da produção de óxido nítrico e, também, stress oxidativo provocado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bartorelli e Marenzi, 2008).

Não existe tratamento específico para nefropatia por contraste, a prevenção é a melhor forma de lidar com a doença. As principais medidas de suporte são a utilização de baixas doses, com o mínimo necessário do meio de contraste; a escolha do meio de contraste, de baixa osmolaridade ou iso-osmolar; hidratação do paciente com bicarbonato isotônico, antes e após o procedimento; uso de N-acetilcisteína como um fármaco nefro protetor, que atua com efeitos vasodilatadores

sobre os vasos renais, contribuindo para a melhoria da hemodinâmica; e suspender uso de fármacos nefrotóxicos (Santos et al., 2011). Além do uso de N-acetilcisteína, também foram testados ácido ascórbico (vitamina C) e α -tecoferol (vitamina E) para prevenir NIC, devido às suas atividades antioxidantes (McCullough et al., 2013; Kongkham et al., 2013), no entanto, não foram encontrados resultados consistentes, levando à busca de outras substâncias com potencial renoprotetor.

No Brasil, são 25 espécies de *Achyrocline* spp. distribuídas, principalmente, pelos estados do sul (Deble, 2007). *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. é nativa da América do Sul, ocorrendo na Argentina e Uruguai. No Brasil, ocorre no Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (Loeuille, 2010). As inflorescências de *Achyrocline satureioides* são muito usadas na medicina popular na forma de chá. Cresce em solos arenosos ou pedregosos até 80 cm, é perene e aromática. É uma planta medicinal tradicional do sul do Brasil onde é conhecida como "Macela" ou "Marcela", e sua coleta pela população é realizada quase que exclusivamente no período da manhã da sexta-feira que antecede a Páscoa, chamada de sexta-feira santa.

Estudos realizados com a espécie *Achyrocline satureioides* (Lam) evidenciaram diversos efeitos biológicos, como antioxidante (Ares et al., 2010), hepatoprotetor (Kadarian et al., 2002), anti-inflamatório, contra distúrbios do trato gastrointestinal, analgésico e antiespasmódico (Simões et al., 1988), além de antimicrobiano (González et al., 2015) e efeito neuroativo (Megret et al., 2013). Também foram relatados efeitos contra *Trypanosoma evansi* (Baldissera et al., 2014) e inibição da formação de úlceras induzidas por etanol em ratos (Santin et al., 2010). Estudo com infusões da planta mostrou citoproteção contra lesões em células por H₂O₂ (Arredondo et al., 2004) e que seu uso via oral de até 5g/kg não apresenta toxicidade (Rivera et al., 2004). Extratos aquosos não causam efeitos citotóxicos ou efeitos genotóxicos (Sabini et al., 2013). Além disso, estudo recente aponta os flavonoides quercetina, luteolina e O-metilquercetina presentes na Macela como moléculas promissoras no tratamento do câncer (Carini et al., 2014).

Considerando o potencial terapêutico da planta *A. satureioides*, bem como a presença de antioxidantes e anti-inflamatórios em sua composição, o sinergismo entre essas substâncias, na forma de extrato bruto, pode ser eficaz na prevenção da nefropatia induzida por contraste. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a

possível ação nefro protetora de extrato etanólico de *A. saturoioides* em nefropatia induzida por meio de contraste iodado em camundongos, bem como determinar a atividade antioxidante, teor de fenólicos e flavonoides totais, e quantificação de quercetina em extratos etanólicos da planta.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

As substâncias 2,2-difenil-1-picrilhidrazila(DPPH), 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), tert-butilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno(BHT), Trolox, quercetina e reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Etanol, acetonitrila, acetato de sódio trihidratado,carbonato de sódio,metenamina, acetona, acetato de etila, cloreto de alumínio,cloreto férrico e persulfato de potássio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Amostra

Inflorescências de *A. satureioides* (Lam.) DC Asteracea foram coletadas no município de Giruá, no Rio Grande do Sul, Brasil, em 03 de abril de 2013 (Latitude: -28.037686; Longitude: -54.336596). A planta foi identificada pela botânica MSc. Solange Schneider, e um espécime foi depositado no herbário da UVV-ES (nº 2384).

2.3 Extração

Para a obtenção dos extratos de *A. satureioides* foram avaliados dois métodos de extração, maceração e maceração assistida por ultrassom, e os solventes etanol 80% e etanol 100% (M80%, M100%, U80% e U100%). Cada extração foi realizada em triplicata com 20g de inflorescências de *A. satureioides*, pulverizadas em moinho, com 400 mL dos respectivos solventes. A maceração foi realizada durante sete dias com posterior filtragem do solvente e remaceração do resíduo por mais 24h. Após a filtragem em papel filtro, as frações orgânicas foram reunidas e o solvente removido em rota-evaporador à vácuo a 60° C. A maceração assistida por ultrassom foi realizada com 3 ciclos de 30 minutos. Após a filtragem em papel filtro, o resíduo foi novamente extraído em mais um ciclo de 30 minutos, filtrado, e as frações orgânicas reunidas para eliminação do solvente em rota-evaporador à vácuo a 60° C. Os extratos secos foram armazenados em frascos de vidro com tampa, encobertos por papel alumínio e armazenados sob-refrigeração.

2.4 Compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais (CFT) foi realizada nos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton et al. (1999) modificado por Scherer e Godoy (2014). Foram utilizados 0,5 mL dos extratos na concentração de 1,5 mg/mL em metanol e 2,5 mL do reagente Folin diluído em água destilada (1:10). Após 5 minutos, foram adicionados 2mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%. A reação ocorreu durante 2 horas no escuro e a absorbância foi monitorada a 740 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico através de curva de calibração externa.

2.5 Flavonoides totais

A quantificação dos flavonoides totais foi realizada por método espectrofotométrico, após reação com cloreto de alumínio (Krepesky et al., 2012). Uma alíquota de 60 mg de extrato foi transferida para balão de fundo redondo de 250 mL onde foram adicionados 0,5 mL de solução aquosa de metenamina 0,5% m/v, 10 mL de acetona e 3,5 mL de HCl 25% (m/v), deixando-se em ebulição por 30 minutos sob refluxo. Após resfriamento, o extrato foi filtrado em algodão para balão volumétrico de 25mL. Lavou-se com acetona o resíduo presente nas vidrarias, transferindo-se a solução para o balão volumétrico de 25mL e o volume foi completado para 25 mL com acetona. Deste extrato, foram transferidos 10 mL para um funil de separação juntamente com 10 mL de água. A solução foi extraída uma vez com 8mL e três vezes com 5 mL de acetato de etila. As fases em acetato de etila foram reunidas em outro funil de separação, lavadas duas vezes com 25 mL de água, transferidas para um balão volumétrico de 25 mL através de filtração por sulfato de sódio anidro (5 g), completando-se o volume com acetato de etila. Esta solução foi denominada solução de partida.

Para o preparo da solução de análise, tomou-se uma alíquota de 10 mL da solução de partida, a qual foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio hexa-hidratado e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Como branco, para a leitura no espectrofotômetro, empregou-se solução de compensação, obtida pela diluição de alíquota da solução de partida (10 mL) em balão volumétrico de 25 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). A absorção da solução de análise foi determinada após 30 minutos da adição da solução de cloreto de alumínio, a 425

nm, empregando-se como branco a solução de compensação. O resultado foi expresso como porcentagem de flavonoides totais calculados como quercetina anidra, obtido a partir da equação da reta das curvas analíticas.

2.6 Quantificação de quercetina por CLAE-EM/EM

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório Tommasi Analítica LTDA (Vila Velha, Espírito Santo, Brasil) de acordo com Zhu et al. (2012), modificado. Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Agilent Série 1200), acoplado a um detector de massas tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems API 3200) com ionização por Electrospray (LC-ESI-MS/MS) em modo positivo. Foi utilizada uma coluna Agilent Eclipse C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 mm) a 35°C. A fase móvel consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico (0,05% v / v) (A) e acetonitrila (B) usando uma eluição gradiente a 0,3 mL/min de 10-60% de B em 0-8 min, 60-90 % de B em 8-12min, 90-10% de B em 12-15 min, e o tempo de condicionamento foi de 6 minutos. A pressão do nebulizador foi de 50 psi. A temperatura do gás foi de 650°C, e a voltagem capilar foi de +5500 V. As amostras foram diluídas com etanol HPLC (0,01 mg/mL) e filtradas. A detecção foi realizada em modo SRM (Selected Reaction Monitoring) sendo as transições monitoradas de 301,9/153,1 para quantificação e 301,9/137,1 para confirmação. A quantificação de quercetina foi realizada por curva de calibração externa com 7 pontos.

Os parâmetros de validação avaliados foram os seguintes: seletividade, linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação. A seletividade foi avaliada com base na pureza do espectro de massa. A precisão (intra-dia) foi avaliada com sete análises consecutivas, enquanto que a precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada com 15 ensaios em três dias diferentes. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pela relação sinal-ruído, 3 e 10 vezes, respectivamente.

2.7 Atividade antioxidante

2.7.1 Método DPPH

Foi utilizado o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) segundo Scherer e Godoy (2009), para determinar a atividade antioxidante dos extratos de *A. saturoioides*. Utilizaram-se 3,9 mL de solução de DPPH (0,1 mM) em metanol e 0,1 mL dos extratos em diferentes concentrações finais. No branco, 3,9 mL de DPPH (0,1 mM)

em metanol e 0,1 mL de metanol. Após a adição dos extratos, agitaram-se os tubos vigorosamente e foram deixados em repouso por 90 minutos no escuro. Após esse período, a atividade antioxidante foi medida em um espectrofotômetro ($\lambda = 517 \text{ nm}$), previamente calibrado com metanol puro. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O índice DPPH foi calculado através da equação 1: $I (\%) = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100$, onde Abs_0 é a absorvância do branco e Abs_1 é a absorvância da amostra. O IR50 (quantidade suficiente para 50% de redução) foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração que reduz 50% dos radicais livres). A ação antioxidante dos extratos foi expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) que é calculado pela equação 2: $IAA = \text{concentração final de DPPH } (\mu\text{g/mL})/IR50 (\mu\text{g/mL})$. A atividade antioxidante dos extratos foi comparada com a ação da quercetina e dos antioxidantes sintéticos TBHQ, BHA, BHT e Trolox. A atividade foi classificada como fraca ($IAA < 0,5$), moderada ($0,5 < IAA < 1,0$), forte ($1,0 < IAA < 2,0$) e muito forte ($IAA > 2,0$) de acordo com Scherer e Godoy (2009).

2.7.2 Método ABTS

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do seqüestro do radical livre ABTS de acordo com Re et al. (1999) modificado. Inicialmente, formou-se o radical $ABTS^{•+}$ pela mistura de 7,0 mM de ABTS (etanol 50%) com 2,45 mM de persulfato de potássio (água destilada). Esse reagente foi armazenado em refrigeração por no mínimo 16h. Antes da utilização, o reagente foi diluído com etanol 50% até obter absorvância de 1,0 ($\pm 0,01$), a 734 nm. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 270 μL do radical $ABTS^{•+}$ e 30 μL de cada concentração dos compostos. No branco adicionaram-se 30 μL de etanol. Após 6 minutos de reação no escuro, foi realizada a leitura em 734 nm utilizando leitora de microplacas. A atividade de eliminação de radicais calculou-se da seguinte forma: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$. Onde a absorvância Abs_0 é a do branco e ABS_1 é a absorvância do teste. Os resultados foram expressos em IR50 (concentração que reduz 50% dos radicais livres), que foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração final $\mu\text{g/mL}$ vs $I\%$). A atividade antioxidante dos extratos foi comparada com a ação da quercetina e dos antioxidantes sintéticos TBHQ, BHA, BHT e Trolox.

2.7.3 Método FRAP

A atividade antioxidante também foi analisada através do método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) de acordo com Benzie et al. (1996), modificado. Para o preparo do reagente FRAP misturou-se 25 mL da solução de acetato de sódio trihidratado (0,3 M; pH 3,6), 2,5 mL da solução de TPTZ (10 mM/L) em HCl 40 mM e 2,5 mL da solução aquosa de cloreto férrico (20 mM) , totalizando 30 mL de solução FRAP, que foi utilizada imediatamente após a sua preparação. Uma alíquota de 30 µL das soluções dos testes foi adicionada juntamente com 270 µL do reagente FRAP. No branco adicionaram-se 30µL de etanol e 270 µL do reagente FRAP. Após 5 minutos de reação, realizou-se a leitura em 595 nm, utilizando leitora de microplacas. A atividade antioxidante foi calculada da seguinte forma: $I\% = (Abs1 - Abs0) \times 100$. Onde a absorbância Abs0 é a do branco e ABS1 é a absorbância do teste. Os resultados foram expressos em IR50 (concentração que reduz 50% dos radicais livres), calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração(concentração final µg/mL vsI%).A atividade antioxidante dos extratos foi comparada com a ação da quercetina e dos antioxidantes sintéticos TBHQ, BHA, BHT e Trolox.

2.8 Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora

2.8.1 Tratamento e indução de nefropatia por contraste

Para a análise "*in vivo*" foram utilizados camundongos adultos da espécie Swiss, machos, pesando entre 25 - 40 g. Os animais foram obtidos a partir do Laboratório de Monitoramento Experimental da Universidade de Vila Velha (UVV), do Espírito Santo, Brasil. Os animais receberam uma dieta de ração e água, e foram mantidos em temperatura média de 22 °C, em ciclo claro e escuro de 12 horas cada.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UVV) parecer nº 268/2013. Para indução da nefropatia por contraste (NIC), foi usado um modelo previamente validado em camundongos e ratos que produz de forma confiável a nefropatia, por Lee et al. (2006) e Billings et al. (2008). Foram estudados 6 grupos com seis animais por grupo: grupo Controle (C), grupo Nefropatia Induzida por Contraste (NIC); grupo N-acetilcisteína 200 mg/kg (NAC); grupo quercetina 10mg/kg (Q); grupo Macela 10 mg/Kg (M10); e grupo Macela 50 mg/Kg (M50). As doses foram ministradas via oral por 5 dias consecutivos (0,3 mL). Os animais dos

grupos M10 e M50 receberam soluções preparadas à partir do extrato U100% em PBS . Os grupos C e NIC receberam água. Após o 5º dia, todos os grupos foram privados de água por 21 h e a partir deste tempo foi realizada a indução de nefropatia por meio de contraste.

A NIC foi induzida com associação de 3 substâncias: 1) indometacina, um inibidor da cicloxigenase (10 mg / kg i.p., dissolvido em dimetilsufóxido), 2) L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, (10 mg / kg i.p., dissolvido em água deionizada) e após 15 minutos, 3) o contraste radiológico de segunda geração e baixa osmolaridade, Ioversol (Optiray 320 Mallinckrodt Medical, Inc., St. Louis, MO, 1,5g de iodo/kg). Grupo controle não recebeu indução de nefropatia. Os animais voltaram imediatamente a ter acesso à comida e água, e finalmente após 24h foram anestesiados com Tiopental (200 mg/kg, ip.) para a coleta do sangue venoso através da punção por agulha no átrio direito para dosagens bioquímicas, e dos rins para quantificação de biomarcadores de *stress* oxidativo e ensaios histopatológicos.

2.8.2 Análise bioquímica de uréia e creatinina sérica.

As análises da concentração sérica de ureia e creatinina foram obtidas através de amostras do soro obtido após centrifugação do sangue coletado (5000g por 7 min) e análise por kit colorimétricos através de ação cooperativa de pesquisa no laboratório de análises clínicas Tommasi Laboratório em Vila Velha (Espírito Santo, Brasil).

2.8.3 Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)

Com os mesmos rins direitos dos animais conservados a -80° C, uma porção foi utilizada para determinação da AOPP (marcador pró oxidante). Os níveis dos produtos avançados de oxidação proteica presentes no soro foram determinados por meio de um método que consiste na mistura de 40 µL de soro a 160 µL de PBS (tampão fosfato salino) e 20 µL de ácido acético glacial (ultrapuro), a qual será feita diretamente em microplaca de fundo chato. A leitura da absorbância foi realizada com comprimento de onda de 340 nm. A curva para a realização desta leitura será feita com o uso de cloramina T (curva de 10 a 100 mM) e iodeto de potássio (1,16 M), misturando-se 200 µL dos padrões a 10 µL de iodeto de potássio e 20 µL de ácido acético e agitando a placa por seis minutos antes da leitura. O resultado final será expresso em µmol/L. (Matteucci et al., 2001)

2.8.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras dos rins esquerdos dos animais tratados, não tratados e controle foram fixadas (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 2%) em solução tamponada (Cacodilato 0,1mol/L) por 24 horas e posteriormente lavadas em tampão Cacodilato (0,1 mol/L; pH 7,2-7,4) para pós-fixação em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e Tetróxido de Ósmio 1,0% tamponadas (Cacodilato 0,1mol/L) por uma hora a temperatura ambiente. Após a pós-fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão cacodilato 0,1M. Para a criofatura, seguiu-se então a etapa de infiltração com glicerol, que tem por finalidade evitar a formação de cristais de gelo na amostra. O glicerol 30% foi adicionado na amostra lentamente em intervalos de 5 minutos até atingir a concentração de 15%, após isso esta solução foi removida e substituída por solução de glicerol 30% em tampão cacodilato 0,1M onde permaneceu por 2 horas. As amostras foram congeladas em freezer -80°C e fraturadas utilizando uma pinça previamente resfriada. As fraturas dos rins foram lavadas com solução tampão cacodilato e água deionizada, seguido da desidratação em diferentes concentrações de etanol e levadas para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis) e posterior cobertura de ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum) para visualização em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da UFES.

2.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM e para análise estatística foi realizada ANOVA de 1 via seguido do post hoc de Tukey, com significância aceita quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Rendimento de extração, teor de fenólicos, flavonoides totais e quercetina

Na avaliação dos métodos de extração utilizados, observou-se que os extratos obtidos por extração com etanol 100% apresentaram significativamente maiores rendimentos ($p < 0,05$), como mostra a Tabela 1. Santin et al. (2010) reportaram um rendimento de 9,6% de extrato bruto ao utilizar etanol 70% na extração por maceração por 7 dias, corroborando com o presente trabalho. No conteúdo de fenólicos totais, determinado através do método de Folin Ciocauteau, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos, onde o extrato obtido por maceração assistida por ultrassom apresentou maior rendimento, como observado na Tabela 1. O extrato U100% revelou maior concentração de fenólicos totais e flavonoides totais.

Foram realizadas análises por CLAE MS/MS para quantificar o teor de quercetina nos extratos e se os métodos de extração utilizados também afetaram significativamente no teor deste flavonoide. Os resultados mostraram a mesma tendência dos ensaios anteriores, o extrato U100% novamente apresenta significativamente ($p < 0,05$) maior teor de quercetina que os demais extratos (Tabela1).

TABELA 1 Determinação do rendimento total de extração, teor de fenólicos totais, flavonoides totais e quercetina nos extratos etanólicos de *A. satyroides*.

Amostras	Rendimento (g/100g de vegetal)	Fenólicos totais (mg GAE/g de extrato)	Flavonoides totais (mg/g de extrato)	Quercetina (mg/g de extrato)
M80%	9,87 ± 0,78bc	231,8 ± 9,7 c	43,56 ± 1,4bc	48,8 ± 2,4 b
M100%	11,23 ± 0,7 ba	221,0 ± 11,1 c	45,93 ± 0,8b	49,1 ± 1,8 b
U80%	8,30 ± 0,98c	250,1 ± 6,3 b	40,87 ± 3,1c	51,0 ± 0,7 b
U100%	12,68 ± 1,42a	283,3 ± 10,8 a	56,07 ± 0,6a	70,4 ± 2,1 a

M80%: maceração com etanol 80%; M100%: maceração com etanol 100%; U80%: maceração assistida por ultrassom com etanol 80%; e U100%: maceração assistida por ultrassom com etanol 100%. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferença significativa ($p < 0,05$). GAE: equivalente de ácido gálico.

3.2 Atividade Antioxidante

Atividade antioxidante analisada pela capacidade de reduzir o radical livre DPPH• é apresentada na Tabela 2. Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante muito forte de acordo com a classificação proposta por Scherer e Godoy (2009), apresentando valores de IAA acima de 2,0. Entretanto, o extrato U100% apresentou atividade significativamente maior ($p < 0,05$) que os demais extratos, além disso,

apresentou mesma potência que o antioxidante sintético BHT ($p > 0,05$). Resultados similares foram encontrados pelo método FRAP, onde o extrato U100% mostrou maior atividade antioxidante entre os extratos e atividade similar os antioxidantes sintéticos BHT e Trolox (Tabela 2). A atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS também capacidade antioxidante para todos os extratos, entretanto, não foi verificada diferença significativa entre os extratos avaliados ($p > 0,05$).

TABELA 2 Atividade antioxidante dos extratos de *Achyrocline satureioides* pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP.

Amostras	DPPH	ABTS	FRAP
	IAA	IR ₅₀ (µg/mL)	IR ₅₀ (µg/mL)
M80%	3,1 ± 0,1 e	19,8 ± 0,9 a	6,2 ± 0,3 a
M100%	2,5 ± 0,1 e	21,8 ± 0,8 a	5,5 ± 0,2 a
U80%	3,1 ± 0,1 e	19,8 ± 0,5 a	5,9 ± 0,3 a
U100%	3,3 ± 0,0 d	21,3 ± 0,4 a	4,2 ± 0,2 b
Quercetina	14,2 ± 0,8 a	2,4 ± 0,1 d	1,6 ± 0,1 d
BHA	10,0 ± 0,7 b	4,5 ± 0,3 c	3,8 ± 0,2 c
BHT	3,9 ± 0,2 d	5,3 ± 0,7 c	4,7 ± 0,2 b
TBHQ	10,6 ± 0,6 b	4,4 ± 0,8 c	3,9 ± 0,3 c
Trolox	6,5 ± 0,2 c	7,3 ± 0,5 b	4,8 ± 0,3 b

M80%: maceração com etanol 80%; M100%: maceração com etanol 100%; U80%: maceração assistida por ultrassom com etanol 80%; e U100%: maceração assistida por ultrassom com etanol 100%. IAA: Índice de atividade antioxidante. IR₅₀: concentração que reduz 50% dos radicais livres. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferença significativa ($p < 0,05$).

3.3 Resultados In Vivo

3.3.1 Análise de creatinina e ureia

Ao observarmos as concentrações plasmáticas de creatinina e ureia (Figura 1) nos animais submetidos à nefropatia por contraste, podemos afirmar que a indução da nefropatia foi bem-sucedida, pois os valores do grupo NIC foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao do grupo controle.

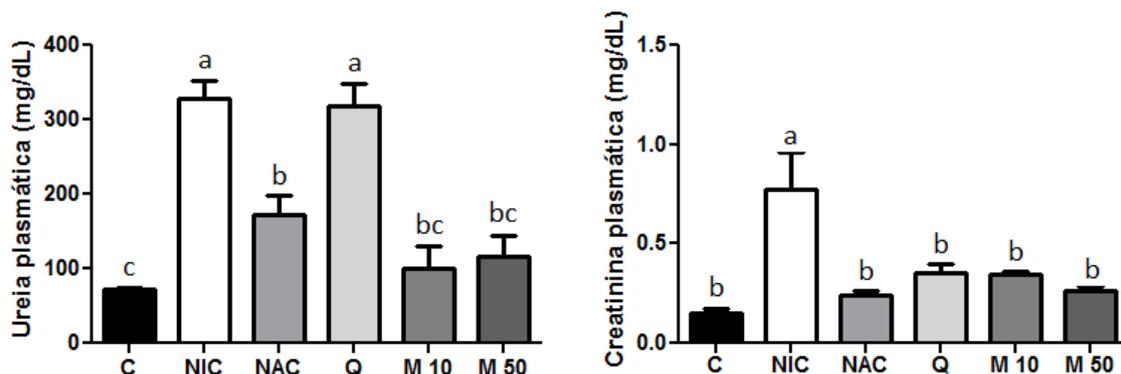


Figura 1 Níveis séricos de ureia e creatinina nos grupos: C (controle); NIC (nefropatia induzida por contraste); NAC (nefropatia induzida por contraste + N-acetilcisteína 200 mg/kg); Q (nefropatia induzida por contraste + quercetina mg/kg); M 10 (nefropatia induzida por contraste + macela 10 mg/kg); e M50 (nefropatia induzida por contraste + macela 50 mg/kg). Letras diferentes correspondem a diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de creatinina plasmática em NIC ($0,77 \pm 0,18$ mg/dL) comparado ao grupo controle ($0,15 \pm 0,02$ mg/dL) (Figura 1). Por outro lado, os animais tratados com NAC ($0,24 \pm 0,02$ mg/dL), Q ($0,35 \pm 0,05$ mg/dL) e com extratos de Macela M10 ($0,34 \pm 0,02$ mg/dL) e M50 ($0,27 \pm 0,02$ mg/dL) apresentaram uma redução significativa dos níveis de creatinina em relação ao grupo NIC, e não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), demonstrando que tanto a quercetina quanto os extratos de Macela apresentam habilidade para proteção das funções renais contra os efeitos nocivos provocados pelo contraste, como taxa de filtração glomerular insuficiente evidenciada pela azotemia. Além disso, uma dose de 10 mg/Kg de quercetina ou do extrato de Macela apresentou mesma eficácia que a dose de 200 mg/kg de NAC, ou seja, 20 vezes maior.

As concentrações de ureia plasmática também demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis dos grupos NIC ($302,6 \pm 26$ mg/dL), NAC ($171,7 \pm 26$ mg/dL) e Q ($318,9 \pm 29$ mg/dL) em relação ao grupo controle ($71,5 \pm 3$ mg/dL) (Figura 1). Resultados promissores são verificados nos animais tratados com extratos de Macela M10 ($99,5 \pm 30$ mg/dL) e M50 ($115,9 \pm 28$ mg/dL), que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 1), evidenciando que o sinergismo entre as moléculas bioativas presentes no extrato, torna o extrato mais eficaz na manutenção dos níveis plasmáticos de ureia quando comparada com 200 mg/kg de NAC e com a quercetina isolada, pois não houve diferença significativa entre os grupos NIC e Q ($p > 0,05$).

3.3.2 Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)

Os resultados de AOPP expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína (Figura 2) mostram que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de produtos de oxidação proteica nos grupos NIC ($295,8 \pm 18$ $\mu\text{mol/mg}$), NAC ($266,3 \pm 18$ $\mu\text{mol/mg}$) e Q ($287,9 \pm 34$ $\mu\text{mol/mg}$) comparados com o grupo controle ($179,6 \pm 11$), revelando que a substância N-acetilcisteína, comumente utilizada na prevenção da nefropatia por

contraste, não foi eficaz para evitar os danos oxidativos gerados pelo radiocontraste, assim como a quercetina isolada ($p > 0,05$). Por outro lado, os grupos tratados com os extratos de Macela M10 ($145,9 \pm 4 \mu\text{mol/mg}$) e M50 ($148,5 \pm 3 \mu\text{mol/mg}$) foram capazes de prevenir os danos oxidativos, pois não houve diferença com o grupo controle ($p > 0,05$), novamente evidenciando que a ação sinérgica dos compostos presentes no extrato U100 apresentam ação nefroprotetora mais promissora.

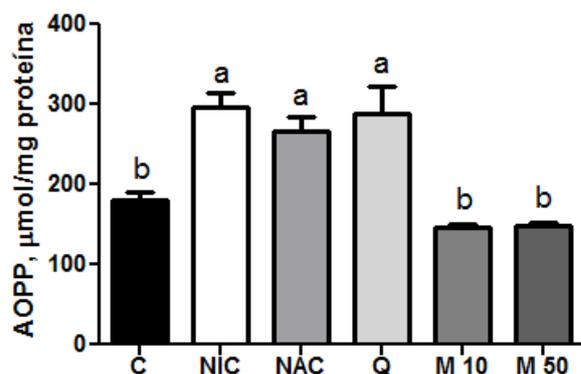


Figura 2 Níveis de produtos avançados de oxidação protéica nos grupos: C (controle); NIC (nefropatia induzida por contraste); NAC (nefropatia induzida por contraste + N-acetilcisteína 200 mg/kg); Q (nefropatia induzida por contraste + quercetina 10 mg/kg); M 10 (nefropatia induzida por contraste + macela 10 mg/kg); e M50 (nefropatia induzida por contraste + macela 50 mg/kg). Letras diferentes correspondem a diferença significativa ($p < 0,05$).

3.3.3 Microscopia por varredura (MEV)

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se no grupo NIC um tufo glomerular encolhido, podócitos atípicos, perda de coesão estrutural, congestão luminal e degeneração vacuolar das células epiteliais tubulares, como mostra a Figura 3. Apenas o grupo M50 mostrou atenuação da lesão induzida por contraste iodado em ambos os podócitos glomerulares e células tubulares. Os grupos NAC e M10 também apresentaram uma leve atenuação quando comparados ao grupo Q, que, por sua vez, mostrou-se parecido com NIC.

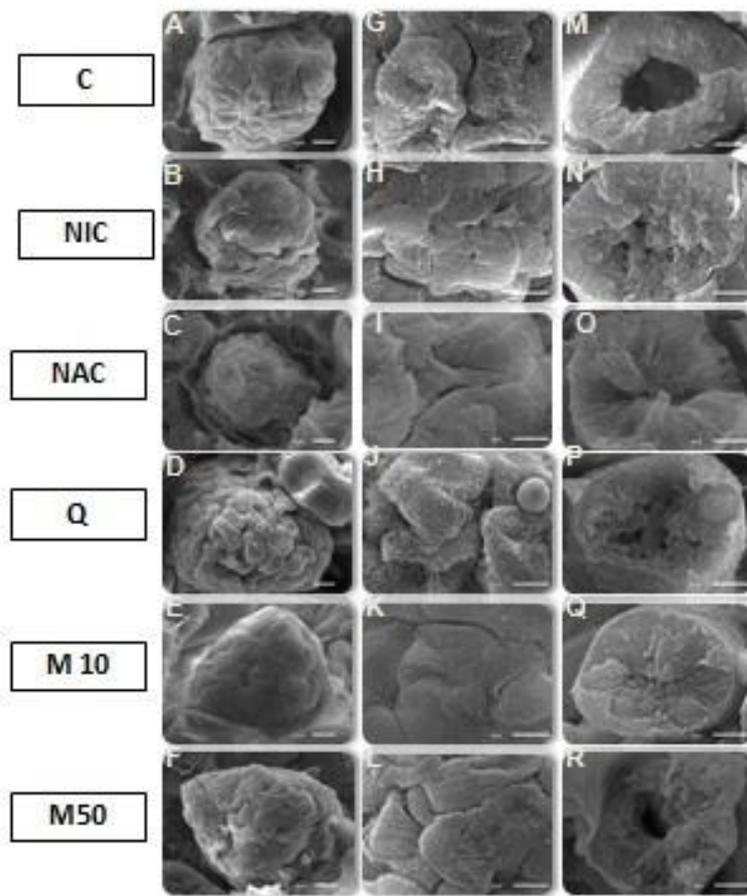


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura ilustrando glomérulos (A-F), podócitos (G-L) e túbulos renais (M-R). C (controle); NIC (nefropatia induzida por contraste); NAC (nefropatia induzida por contraste + N-acetilcisteína 200 mg/kg); Q (nefropatia induzida por contraste + quercetina 10 mg/kg); M 10 (nefropatia induzida por contraste + macela 10 mg/kg); e M50 (nefropatia induzida por contraste + macela 50mg/kg).

4 DISCUSSÃO

Diante das atividades biológicas atribuídas aos compostos fenólicos, em especial à quercetina, descritos na literatura como antitumoral (Carini et al., 2014) e antioxidante (Scherer e Godoy, 2009), e levando-se em conta os resultados obtidos pelas análises *in vitro* dos diferentes extratos de *A. saturoioides*, obteve-se maior rendimento, maiores teores de flavonoides e fenólicos totais, bem como maior teor de quercetina através do extrato U100%, portanto, foi ele o escolhido para avaliar a possível ação nefroprotetora em camundongos submetidos à nefropatia induzida por contraste. Estudos anteriores relatam que os principais compostos fenólicos presentes em extratos de *A. saturoioides* são quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina (De Souza et al., 2002; Arredondo et al., 2004; Hatami et al., 2012; Carini et al., 2014), e ácidos fenólicos hidroxibenzoicos, principalmente o ácido gálico (De Souza et al., 2002; Hatami et al., 2012). O flavonoide quercetina apresenta inúmeras ações biológicas relatadas na literatura. Estudo realizado com extrato Macela contendo 3 mg/mL de quercetina, mostrou melhora do sono em pacientes diagnosticados com Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) (Pedemonte et. al, 2013). Em estudo prévio, a quercetina isolada apresentou significativa redução da toxicidade renal induzida pela toxina estreptozotocina (STZ) em ratos com nefropatia diabética (Gomes et al., 2014).

Estudos relatam forte atividade antioxidante a extratos de Macela (Arredondo et al., 2004; Vargas et al., 2013), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Dentre os compostos testados, a quercetina apresentou significativamente maior atividade antioxidante ($p < 0,05$) em todos os métodos avaliados (Tabela 2), corroborando com estudos prévios que apontam a quercetina como uma promissora molécula no tratamento de diversas patologias (Carini et al., 2014).

O meio de contraste radiológico causa um aumento na produção de ROS que leva ao aumento da resistência vascular renal, com isso, diminui-se o fluxo sanguíneo renal e, conseqüentemente, diminui a taxa de filtração glomerular. Ao observarmos as dosagens séricas de creatinina e uréia nos animais submetidos à nefropatia por contraste e os demais grupos, podemos verificar o sucesso da indução da nefropatia, pois os valores do grupo NIC tiveram diferenças estatísticas dos valores do grupo controle. No grupo NIC, notamos a elevação dos valores de creatinina $\geq 25\%$, como relatado em outras pesquisas em ratos e camundongos (Billings, et al.

2008; Lee et al 2006). Interessante ressaltar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos M10 e M50 para as concentrações de creatinina e ureia, mostrando que mesmo na menor dosagem (10 mg/kg) o extrato de Macela mostrou-se eficaz, inclusive com resultados mais promissores que estudos prévios, onde foram utilizadas dosagens de 100 mg/kg de extrato de semente de uva (Ozkan et al., 2012), 300 mg/kg de resina de *Virola oleifera* (Bôa et al., 2015), e 500 mg/Kg de *Phyllanthus emblica* (Tasanarong et al., 2014) na proteção contra disfunção renal.

Este estudo é o primeiro que investiga os efeitos de *A. saturoioides* na função e estrutura renal sobre o estresse oxidativo em nefrotoxicidade induzida por meio de contraste radiológico em camundongos. Constatou-se que os extratos de Macela (M10 e M50) tem um efeito protetor na disfunção renal e uma melhora da lesão causada pelo estresse oxidativo induzido por NIC através dos dados obtidos por marcadores bioquímicos e pelos produtos de oxidação protéica, sendo, na maior parte das análises, semelhantes ou mais eficazes do que N-acetilcisteína, que é comumente usado na prevenção da nefropatia por contraste. Além disso, M50 reduziu acentuadamente a incidência de lesões glomerulares e das células tubulares, como observado nas análises histológicas.

Apesar de na literatura encontrarmos estudos elucidando efeito renoprotetor de quercetina isolada (Gomes et al., 2014), no presente estudo ela não se mostrou como a melhor opção para a prevenção das lesões renais causadas por contraste radiológico. Os melhores resultados foram os obtidos com extratos de Macela, que se assemelharam aos de NAC, todavia, ainda se mostraram mais eficazes contra a oxidação protéica e lesões nas estruturas de glomérulos e túbulos renais (Figuras 2 e 4), contribuindo para uma melhor proteção das funções renais, visualizada pela menor taxa de ureia plasmática evidenciando uma melhor função renal (Figura 1).

5 CONCLUSÃO

A extração realizada com etanol 100% através de maceração assistida por ultrassom mostrou-se mais eficiente e mais rápida, pois obteve-se maiores valores de rendimento, teor de fenólicos e flavonoides totais, e quercetina. Os extratos de *A. saturoides* apresentaram forte ação antioxidante em todos os métodos avaliados. Neste modelo de nefropatia, 10 mg/kg de extrato de Macela mostrou-se eficaz na proteção das funções renais contra o contraste, verificado pela manutenção das taxas plasmáticas de ureia e creatinina, além disso, apresentou resultados mais promissores que 200 mg/kg de N-acetilcisteína, e que 10 mg/kg de quercetina, indicando dessa forma que sua ação contra os danos oxidativos provocados por contraste iodado se deve pelo sinergismo de seus compostos, e não somente pela presença de quercetina.

6 REFERÊNCIAS

1. Alioglu E, Saygi S, Turk U, Kirilmaz B, Tuzun N, Duman C, Tengiz I, Yldiz S, Ercan E. N-acetylcysteine in preventing contrast-induced nephropathy assessed by cystatin C. *Cardiovasc Ther* 2013; 31 (3) 168-173. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00309 PMID: 22212518
2. Andreucci M, Faga T, Pisani A, Sabbatini M, Michael A. Acute kidney injury by radiographic contrast media: pathogenesis and prevention. *Biomed Res Int* 2014; 2014:362725. doi: 10.1155/2014/362725 PMID: 25197639
3. Ares G, Barreiro C, Gámbaro A. Evaluation of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: importance of sensory characteristics. *CyTA - J Food* 2010; 8 (3) 201-207. doi: 10.1080/19476330903353536
4. Arredondo MF, Blasina F, Echeverry C, Morquio A, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Lafon L, Dajas F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 13–20. PMID: 15036461
5. Assareh A, Yazdankhah S, Majidi S, Nasehi N, Mousavi SSB. Contrast induced nephropathy among patients with normal renal function undergoing coronary angiography. *J Renal Inj Prev* 2016; 5(1): 21–24. doi: 10.15171/jrip.2016.05 PMID: 27069963
6. Baldissera MD, Oliveira CB, Zimmermann CEP, Boligon AA, Athayde ML, Bolzan LP, Vaucher R de A, Santurio JM, Sagrilho MR, da Silva AS, Monteiro SG. In Vitro Trypanocidal Activity of Macela (*Achyrocline satureioides*) Extracts against *Trypanosoma evansi*. *Korean J Parasitol* 2014; 52 (3) 311-315. doi: 10.3347/kjp.2014.52.3.311 PMID: 25031474
7. Bartorelli AL, Marenzi G. Contrast-induced nephropathy. *J Interv Cardiol* 2008; 21:74-85. PMID: 18086132
8. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Rev. Anal Biochem* 1996; 239, p.70-76. PMID: 8660627
9. Billings FT, Chen SWC, Kim M, Park SW, Song JH, Wang S, Herman J, D'Agati V, Lee HT. α 2-Adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F741-748. doi: 10.1152/ajprenal.90244.2008 PMID: 18579700

10. Bôa IS, Porto ML, Pereira AC et al. Resin from *Viola oleifera* Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice. PLoS One 2015 Dec 16; 10(12), 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0144329 PMID: 26674346
11. Carini JP, Klamt F, Bassani VL. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. RSC Advances 2014; 4 (7) 3131 – 3144.
12. De Souza KCB, Schapoval EES, Bassani VL. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. J Pharm Biomed Anal 2002; 28, 771-777. PMID: 12008157
13. Deble LP. The *Achyrocline* gender (Less.) DC. Asteraceae: Gnaphalieae in Brazil. Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2007.
14. Gomes IBS, Porto ML, Santos MCLFS, Campagnaro BP, Pereira TMC, Meyrelles SS, Vasquez EC. Efeitos renoprotetor, antioxidante e anti-apoptótico de uma dose baixa de quercetina por via oral no modelo de nefropatia diabética C57BL / 6J. Lipids Health Dis 2014; 13: 184. doi: 10.1186/1476-511X-13-184 PMID: 25381305
15. González MJ, Beoletto VG, Agnese AM, Audisio MC, Marioli JM. Purification of Substances from *Achyrocline satureioides* with Inhibitory Activity Against *Paenibacillus* larvae, the Causal Agent of American Foulbrood in Honeybees' Larvae. Appl Biochem Biotechnol 2015; 175: 3349-3359. doi: 10.1007/s12010-015-1506-5 PMID: 25820295
16. Hatami T, Cavalcanti RN, Takeuchi T et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Macela (Achyrocline satureioides)* flowers: Kinetic, experiments and modeling. J Supercrit Fluid 2012, 65, 71– 77.
17. Kadarian C, Broussalis AM, Miño J et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Pharmacol Res 2002; 45 (1). doi:10.1006/phrs.2001.0904 PMID: 11820863
18. Kongkham S, Sriwong S, Tasanarong A. Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats. Nefrologia 2013; 33(1):116-123. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2012.Nov.11736 PMID: 23364634
19. Krepsky PB, Isidório RG, Filho JDS, Côrtes SF, Braga FC. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea cartha genensis* preparations. Phytomedicine 2012; 19, 953-957. doi: 10.1016/j.phymed.2012.05.011 PMID: 22739415
20. Lee HT, Jan M, Bae SC, Joo JD, Goubaeva FR, Yang J, Kim M. A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290: F1367–F1375. PMID: 16418301

21. Loeuille B. *Achyrocline satureioides* in Lista de Espécie da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2010 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB108826>).
22. Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol* 2001 Dec; 38 (4):187-9. PMID: 11855797
23. McCullough PA, Akrawinthewong K. Ascorbic acid for the prevention of contrast-induced acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(23):2176-2177. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.066 PMID: 23994411
24. Megret FR, Correa DT, Carriquiri JAA, dos Santos GP, Busi MM, Méndez FD. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Marcela) reduce brain damage in permanent focal ischemia in rats. *Rev Cubana Plant Med* 2013; 18 (3).
25. Mohammed NNA, Mahfouz A, Achkar k, Rafie IM, Hajar R. Contrast-induced Nephropathy. *Heart Views* 2013; 14(3): 106–116. doi: 10.4103/1995-705X.125926 PMID: 24696755
26. Pedemonte M, Rivera F, Testa M, Velluti R, Dajas F, Nadruz E. *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. pode melhorar a qualidade do sono em pacientes com apneia obstrutiva do sono: Um estudo piloto. *Sleep Science* 2013; 6 (4) 135-140.
27. Ozkan G, Ulusoy S, Orem A, Ersoz S, Alkanat M, Yucesan FB, Kaynar K, Al S. Protective effect of the grape seed proanthocyanidin extract in a rat model of contrast-induced nephropathy. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35: 445–453. doi: 10.1159/000337926 PMID: 226777922
28. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Rev. Free Radic Biol Med* 1999; 26, p. 9-10. PMID: 10381194
29. Rivera F, Gervaz E, Sere C, Dajas F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). *J Ethnopharmacol* 2004; 95: 359–362. PMID: 15507360
30. Sabini MC, Cariddi LN, Escobar FM, Mánas F, Comini L, Reinoso E, Sutil SB, Acosta AC, Núñez Montoya S, Contigiani MS, Zanon SM, Sabini LI. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides*(Lam.) DC. *Food Chem Toxicol* 2013; 60, 463-470. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.005 PMID: 23948353
31. Santin JR, Lemos M, Júnior LCK, Niero R, de Andrade SF. Efeito antiúlcera de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), uma planta popular

- medicinal, em diferentes modelos experimentais. *J Ethnopharmacol* 2010; 130: 334-339. doi:10.1016/j.jep.2010.05.014
32. Santos RO, Malvar B, Silva R, Ramalho V, Pessegueiro P, Amoedo M, Aniceto J, Pires C. Nefropatia por contraste. *Acta Med Port* 2011; 24(5):809-820.
33. Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem* 2009; 112 (3), 654-658. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.026
34. Scherer R, Godoy HT. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. *Braz J Med Plants* 2014; 161, 41-6. doi: 10.1590/S1516-05722014000100006
35. Seeliger E, Sendeski M, Rihal CS, Persson PB. Contrast-induced kidney injury: mechanisms, risk factors, and prevention. *Eur Heart J* 2012; 33(16):2007-2015. doi: 10.1093/eurheartj/ehr494 PMID: 22267241
36. Simões CMO, Schenke EP, Bauer L, Langeloh A. Pharmacological Investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. *J Ethnopharmacol* 1988; (22): 1281- 293. PMID: 3393010
37. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 1999; 299, 152-178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1
38. Tasanarong A, Kongkham S, Itharat A. Antioxidant effect of *Phyllanthus emblica* extract prevents contrast-induced acute kidney injury. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:138. doi: 10.1186/1472-6882-14-138 PMID: 24755233
39. Vargas RMF, Barroso MST, Neto RG, Scopel R, Falcão MA, da Silva CF, Cassel E. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO₂. *Ind Crop Prod* 2013; 50, 430-435. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.021
40. Zhu ZW, Li J, Gao XM, Amponsem E, Kang LY, Hu LM, Zhang BL, Chang YX. Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygonum multiflori* by LC–MS/MS. *J. Pharm Biomed Anal* 2012; 62: 162– 166. doi: 10.1016/j.jpba.2011.11.002 PMID: 22296653