

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

**ATIVIDADE NEFROPROTETORA DO EXTRATO ENRIQUECIDO
DE POLIFENÓIS DE *Euterpe edulis* Martius**

PRISCYLLA MARIA MARTINS CARDOSO

**VILA VELHA
JUNHO – 2015**

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

**ATIVIDADE NEFROPROTETORA DO EXTRATO ENRIQUECIDO
DE POLIFENÓIS DE *Euterpe edulis* Martius**

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

PRISCYLLA MARIA MARTINS CARDOSO

VILA VELHA
JUNHO – 2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C268a Cardoso, Priscylla Maria Martins.

Atividade nefroprotetora do extrato enriquecido de polifenóis de *Euterpe edulis* Martius / Priscylla Maria Martins Cardoso. – 2015.

46 f.: il.

Orientadora: Denise Coutinho Endringer

Co-orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia Terapêutica 2. Nefropatia. 3. Antioxidantes. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Pereira, Thiago de Melo Costa. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

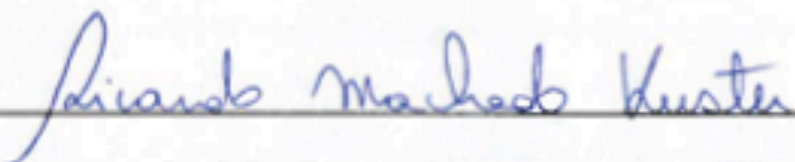
PRISCYLLA MARIA MARTINS CARDOSO

**ATIVIDADE NEFROPROTETORA DO EXTRATO ENRIQUECIDO DE
POLIFENÓIS DE *Euterpe edulis* Martius**

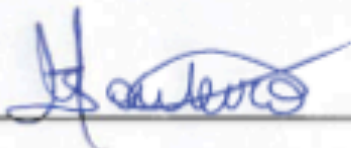
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em Vila Velha, 15 de junho de 2015

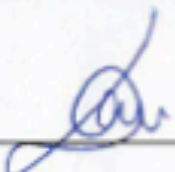
Banca examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster (UFRJ)



Prof. Dr^a. Betania Souza Monteiro (UVV)



Prof. Dr^a. Denise Coutinho Endringer (UVV)
(Orientadora)

Dedico esse trabalho a Deus, que sempre foi minha fortaleza, ao meu marido Rodrigo e filha Luiza, aos meus pais, Jurandir e Wilma, e irmãos Perlla e Junior. Aos queridos amigos e demais familiares. Com todo meu carinho, dedico a vocês essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido.

Aos meus pais, Jurandir e Wilma, meu infinito agradecimento pelo amor incondicional. Minha mãe, meu maior exemplo de dedicação, força e superação. Sempre acreditando em mim, estimulando buscar novos horizontes. Amo vocês!

Ao meu marido, Rodrigo, por ser tão importante na minha vida, sempre a meu lado. Meu maior incentivador, encorajador, parceiro de todos os momentos. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho! À minha filha Luiza, meio raio de sol, que me inspira ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada meus amores!

Aos meus irmãos e melhores amigos, Perlla e Junior, pelo amor e cumplicidade de sempre, divido com vocês essa conquista. Afinal, desde criança, aprendemos que juntos seríamos mais fortes. Aos meus cunhados Paulo e Nany, que já se tornaram irmãos de coração.

Agradeço aos demais familiares e amigos pelo apoio e torcida.

Em especial a minha orientadora, Prof. Dr^a. Denise Coutinho Endringer, pela condução dessa pesquisa com dedicação. Por compartilhar seu conhecimento com tanto carinho e respeito. Por abrir as portas, me estimular ao interesse pela ciência. Pela confiança em suas frases “jovem, você vai brilhar”.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, pelo carinho e suas importantes contribuições na co-orientação desta pesquisa.

Carinhosamente, agradeço a Renata Alves Mazzuco, minha companheira de todas as horas nesses últimos 24 meses. Essa amizade que

nasceu do dia a dia, em cada experimento, espero levar por toda vida. Sua presença tornou tudo mais especial. Desejo muita saúde e sucesso, um futuro brilhante!

Aos demais professores do programa de Ciências Farmacêuticas da UVV, agradeço por compartilhar seu conhecimento com dedicação.

Ao professor e amigo Eduardo Roberto Cole, por ter me apresentado ao programa de Ciências Farmacêuticas da UVV.

Ao Prof. Dr. Carlos Musso, médico patologista que enriqueceu esta pesquisa com suas contribuições nas análises histológicas.

A professora Solange Zanotti Schneider, pela identificação da espécie vegetal objeto desta pesquisa.

Aos parceiros de pesquisa Igor fonte boa, Luzas Dazzi, Bruno Prati, Maria Eduarda Souza e Waléria Baratella. E aos demais amigos e participantes do programa, pela convivência e contribuições.

A Universidade Vila Velha e seus funcionários.

Agradeço a FAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Incaper por gentilmente fornecer o material vegetal desta pesquisa.

A UFES, pela colaboração no processo de liofilização das amostras. Especialmente ao Paulo Wagner do Labsan – UFES.

Ao laboratório TOMASSI, pela realização das análises bioquímicas.

Por fim, o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste sonho, estimulando-me intelectual e emocionalmente. Espero tê-los novamente como parceiros em outros projetos pela vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	3
2.1. Material Vegetal.....	3
2.2. Avaliação da capacidade antioxidante DPPH	3
2.3. Avaliação da capacidade antioxidante ABTS	3
2.4. Quantificação de polifenóis totais.....	4
2.5. Determinação de antocianinas totais.....	4
2.6. Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora da polpa de E. edulis	4
2.7. Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine (AOPP).....	6
2.8. Determinação de toxicidade aguda (DL 50)	6
2.9. Análise histológica	7
2.10. Análise estatística.....	7
3. RESULTADOS	8
3.1. Avaliação da capacidade te de polpa de E. edulis	8
3.2. Quantificação de Polifenóis e antocianinas totais	8
3.3 Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora da polpa de E. edulis pela dosagem de creatinina e uréia.	8
3.4. Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine (AOPP).....	10
3.5. Análise histológica	11
3.6. Determinação de toxicidade aguda (DL 50)	13
4. DISCUSSÃO	15
4.1. Avaliação da capacidade antioxidante de polpa de E. edulis.....	15
4.2. Quantificação de polifenóis e antocianinas totais.....	16
4.3. Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora da polpa de E. edulis pela dosagem de creatinina e uréia.	16
4.4. Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine (AOPP).....	18
4.5. Análise histológica	18
4.6. Determinação de toxicidade aguda (DL 50)	20
5. CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE SIGLAS

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

AOPP: Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine

EAG: Equivalente de ácido gálico

NIC: Nefropatia induzida por contraste

EROs: Espécies reativas de oxigênio

NAC: N- acetilcisteína

IAA: Índice de atividade antioxidante

CI₅₀: Concentração inibitória mínima

BHT: Hidroxitolueno butilado

TBHQ: Terc-butil-hidroquinona

C3G: Cianidina- 3- glicosídeo

HCLO: Ácido hipocloroso

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

KI: Iodeto de potássio

HE: Hematoxilina e eosina

EPM: Erro padrão da média

CN: Controle negativo

EE: *Euterpe edulis*

DL₅₀: Dose letal 50

LRA: Lesão renal aguda

FA: Fosfatase alcalina

GGT: Gama-glutamiltanspeptidase

AST: Aspartato-aminotransferase

RESUMO

Cardoso, Priscylla Maria Martins, Universidade Vila Velha- ES, junho de 2015.
ATIVIDADE NEFROPROTETORA DO EXTRATO ENRIQUECIDO DE POLIFENÓIS DE *Euterpe edulis* Martius. Orientadora: Denise Coutinho Endringer. Co-Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

A nefropatia por contraste está diretamente relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade, no qual é a terceira principal causa de insuficiência renal adquirida em meio hospitalar. O tratamento e prevenção podem ser por administração de produtos antioxidante. O palmitero jussara (*Euterpe edulis* Martius) é uma planta nativa da Mata Atlântica, onde é amplamente utilizada para consumo alimentício. Os frutos de *E. edulis* apresentam compostos fenólicos já conhecidos por sua atividade antioxidante. Este trabalho objetivou avaliar a atividade nefroprotetora da polpa do fruto de *E. edulis* em modelo animal de nefropatia induzida por contraste. Os frutos coletados foram submetidos a despulpamento e quantificação de polifenóis totais por método colorimétrico, antocianinas por método pH diferencial e avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). A avaliação nefroprotetora foi determinada por indução por contraste iodato, tendo sido avaliados os indicadores AOPP (*Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosina*), creatinina e ureia e realizado a análise histológica. A determinação da toxicidade aguda (DL 50) foi realizada de acordo com o protocolo 423 preconizado pela OECD. Os resultados demonstraram que a polpa da *E. edulis* é rica em polifenóis (811±16,7 mg EAG/g) e antocianinas (181,25 mg/100 g), possui atividade antioxidante classificada como muito forte pelo método DPPH, com índice de atividade antioxidante (AAI) 3,4 e pela técnica ABTS (CI₅₀ 0,59±0,03 mg/mL). Nos experimentos *in vivo*, a polpa de *E. edulis* demonstrou tendência de proteção renal em camundongos, diminuindo a disfunção renal e lesões tubulares morfológicas após indução de nefropatia de contraste, através de sua atividade antioxidante promovida por polifenóis.

UNITERMOS: Nefroproteção; *Euterpe edulis*; Polifenóis; Antocianinas; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Cardoso, Priscylla Maria Martins, University Vila Velha- ES, June 2015. **Nephroprotective Activity extract Palmiteiro from rich *Euterpe edulis* Martius.** Advisor: Denise Coutinho Endringer. Co adviser: Thiago de Melo Costa Pereira.

The contrast nephropathy is directly related to increased morbidity and mortality, which is the third leading cause of kidney failure in hospitals. The treatment and prevention may be done by administering antioxidant products. The jussara palm (*Euterpe edulis* Martius) is a native plant of the Atlantic Forest, which is widely used for food consumption. The fruits of *E. edulis* present phenolic compounds known for their antioxidant activity. This study evaluated the nephroprotective effect of the pulp of the fruit of *E. edulis* in an animal model of contrast-induced nephropathy. The fruits were collected and subjected to pulping quantification of total polyphenols by a colorimetric method, for anthocyanins pH differential method and evaluation of the antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila) and ABTS assay (2, 29-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). The evaluation of the nephroprotective effect was determined using an induction contrast nephropathy by contrast iodate, evaluated by AOPP indicators (protein products containing cross-linking Dityrosina). Concentrations of creatine and urea were measured and a histological analysis was performed. The determination of acute toxicity was performed according to the recommended by OECD 423 protocol. The results showed that the pulp of *E. edulis* is a source of polyphenols (811 ± 16.7 mg GAE / g) and anthocyanins (181.25 mg / 100 g). It has a strong antioxidant activity as identified by the DPPH method, with 3.4 AAI (antioxidant activity index) and technical ABTS (IC₅₀ 0.59 ± 0.03 mg / mL). In *in vivo* experiments, the pulp of *E. edulis* demonstrated a renal protection, decreasing renal dysfunction and morphological tubular lesions in mice after contrast nephropathy induction. Most probably those effects are resulting from the antioxidant activity promoted by polyphenols.

KEYWORDS: nephroprotection; *Euterpes edulis*; polyphenols; anthocyanins; antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda, nefropatia por contraste (NIC), é uma afecção iatrogênica originada por procedimentos envolvendo a administração de agentes de contraste iodado, frequentemente utilizados em diagnósticos por imagem, estando também associada ao aumento da morbidade e mortalidade, sendo a terceira principal causa de insuficiência renal adquirida em meio hospitalar (Santos et al. 2011). Elevadas doses de meios de contraste iodados são empregadas em algumas intervenções cardíacas percutâneas, no entanto, podem causar lesão renal aguda (Erley et al. 1996). O comprometimento da função renal é frequentemente percebido por alterações em exames laboratoriais de rotina, como a ureia e principalmente a creatinina (Magro e Vattimo, 2007).

Existem divergências sobre a patogênese exata da NIC, mas é certamente causada por uma combinação de fatores (Osthoff e Trendelenburg, 2013; Andreucci et al. 2014), onde lesão tubular renal e vascular, acompanhada por influências diretas e indiretas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zager et al. 2003; Heyman et al. 2010) são suficientes para as alterações histológicas, especialmente a lesão tubular proximal que se manifestam na NIC, e consequente redução da taxa de filtração glomerular (Billings et al. 2008; Barret e Parfrey, 2006; Andreucci et al. 2014). Uma estratégia que tem sido adotada na seleção de produtos que possam prevenir a NIC é a atividade antioxidante (Andreucci et al. 2014). Neste contexto, a N-acetilcisteína (NAC), o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) foram testados para prevenir a NIC (Pattharanitima e Tasanarong, 2014; McCullough e Akrawinthewong, 2013), sendo a N-acetilcisteína a única que configura o esquema profilático adotado na atualidade.

Os frutos do palmito jussara (*Euterpe edulis* Martius), Arecaceae, apresentam compostos fenólicos conhecidos por sua atividade antioxidante, dentre eles, destacam-se as antocianinas (Paredes-López et al. 2010; Borges et al., 2011; Inacio et al. 2013; Bicudo, Ribani e Beta, 2014). No fruto de *E. edulis*, as antocianinas identificadas são, a antocianina majoritária cianidina 3-O-glicosídeo, além de outras identificadas em menor quantidade como a cianidina 3-O-rutinosídeo, cianidina 3, 5-diglicosídeo, pelargonidina 3-O-rutinosídeo, peonidina 3-O-glicosídeo,

peonidina 3-O-rutinosídeo, cianidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-ramnosídeo (Bicudo et al. 2014; Ribeiro et al. 2011; Brito et al. 2007).

Na busca por novos produtos alternativos para a prevenção de NIC, que possam ser utilizados pela população como um alimento funcional, objetivou-se avaliar a polpa de *E. edulis* na prevenção de modelo experimental de nefropatia induzida por contraste.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Frutos de *E. edulis* foram fornecidos pelo Incaper, coletados na região de Rio Novo do Sul- ES, no mês de agosto 2013. Este material foi identificado pela botânica Solange Zanotti Schneider, MSc, tendo sido tombada uma exsicata no herbário da UVV (UVVES 2396).

Aproximadamente 1 kg de frutos foram despulpados de acordo com técnica de despulpamento utilizada pela população local, sendo imersos em água a 40° C por 60 minutos, até o desprendimento da polpa e da semente. Logo após, semente e polpa foram peneiradas para melhor separação. O material foi liofilizado (liofilizador Labconco Freezone®, modelo 7752020, EUA) em uma taxa de aproximadamente de 10 ml/dia até evaporação total da porção líquida e obtenção do produto de cor roxa em forma de pó, armazenada sob refrigeração a -20°C até o momento dos experimentos.

2.2. Avaliação da capacidade antioxidante DPPH

A atividade antioxidante da polpa de *E. edulis* foi determinada por meio do método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Scherer e Godoy, 2009). A concentração inibitória mínima para inibir 50% da concentração inicial de radicais livres (CI50) foi calculada usando a equação da reta obtida da curva de calibração relacionando concentração com o potencial de inibição do radical DPPH. A ação antioxidante da polpa foi expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) que é a razão entre a concentração de DPPH ($\mu\text{g/mL}$)/IC50 ($\mu\text{g/mL}$), classificando-a de acordo com o valor do IAA obtido (Considerando fraca quando $\text{IAA} < 0,5$, moderada quando entre 0,5 e 1, forte entre 1 e 2 e muito forte quando $\text{AAI} > 2$). O ácido ferrúlico (0,89 a 4,7 $\mu\text{g/mL}$ e R^2 0,99) foi empregado como controle positivo para a atividade antioxidante.

2.3. Avaliação da capacidade antioxidante ABTS

O ensaio com radical ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] foi executado de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999) com modificações. O experimento foi realizado em placas de 96 poços, para o branco usou-se etanol absoluto, como controle foram adicionados 250 μL de

solução radical ABTS + 20 µL de etanol. Para análise das amostras, foram adicionados 250 µL de solução radical ABTS e 20 µL das soluções de polpa *E. edulis* (1,0 a 0,15 mg/mL). O mesmo experimento foi realizado com os padrões antioxidantes BHT (0,62 a 0,08 mg/mL), TBHQ (0,56 a 0,07 mg/mL) e quercetina (0,3 a 0,006 mg/mL). A percentagem de inibição foi lido no comprimento de onda de 734 nm foi relacionada com a concentração da polpa ou padrões. A CI50 foi calculada a partir da equação da reta obtida para cada solução. Os experimentos foram realizados em triplicatas e em três dias diferentes (Equação da reta das amostras: polpa de *E. edulis* $y = 70,5x + 8,83$ e $R^2 = 0,99$; BHT $y = 95,4x + 7,88$ e $R^2 = 0,99$; TBHQ $y = 179,9x + 3,81$ e $R^2 = 0,99$; Quercetina $y = 299,6x + 1,86$ e $R^2 = 0,99$).

2.4. Quantificação de polifenóis totais

A quantificação dos polifenóis totais foi realizada usando a reação de Folin-Ciocalteu, descrita por Souza et al. (2007), com as modificações descritas por Mariani et al. (2013). Empregou-se curva de calibração com padrão ácido gálico (10 a 300 µg/mL). A quantificação dos polifenóis totais foi feita através da equação da reta da curva de calibração $y = 0,0009x + 0,0021$ e $R^2 = 0,96$. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5. Determinação de antocianinas totais

O conteúdo de antocianinas totais monoméricas da polpa do fruto *E. edulis* foi determinado pelo método pH diferencial, descrito por Giusti e Wrosltad (2005). A absorbância final foi calculada empregando-se a equação: Absorbância final = (A520 nm – A700 nm) pH 1 – (A520 nm – A700 nm) pH 4,5, e o teor total de antocianinas pela equação: Teor total de antocianinas = $(A \times MM \times FD \times 1000) / (\epsilon \times l)$.

Onde A = absorbância final, MM = massa molecular, FD = fator de diluição, 1000 = conversão de gramas para miligramas, l = comprimento do caminho óptico em centímetro e $\epsilon = 26900$, coeficiente de extinção molar em L/mol/cm para cianidina-3-glicosídeo (C3G) e o resultado expresso em mg C3G/100g de polpa seca. As análises foram realizadas em triplicata.

2.6. Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora da polpa de *E. edulis*

Foram utilizados 70 camundongos adultos, 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 foram alimentados com uma dieta de ração e água, 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.

Previamente a indução da NIC, os animais foram submetidos a cinco dias de tratamento por gavagem com a polpa de *E. edulis* nas doses de 100 mg/kg; 200 mg/kg e 400 mg/kg, além do antioxidante sintético N- acetilcisteína (NAC) 100 mg/kg, todas as amostras diluídas em solução aquosa na concentração de 50 mg/ml. Realizou-se a indução da nefropatia por contraste iodato após 16 horas de jejum de água, foi utilizado a injeção do contraste radiológico de segunda geração e baixa osmolaridade, ioversol (Optiray 320 Mallinckrodt Medical, Inc., St. Louis, MO, 1,5g de iodo/kg), precedido respectivamente, 15 minutos da inibição de prostanoídes (Indometacina 10 mg/kg, dissolvida em dimetilsufóxido, ip), e a síntese do óxido nítrico (L-NAME 10 mg/kg, dissolvido em 0,9% de soro fisiológico, ip). Após 24 horas, os animais foram eutanasiados sob administração de tiopental 200 mg/kg, ip. O sangue venoso foi coletado do ventrículo esquerdo para dosagens bioquímicas de uréia e creatinina (Billings et al. 2008; Gomes et al. 2014), e os rins removidos para análises histológicas. Este procedimento em camundongos foi adaptado de protocolos previamente validados em camundongos por Lee et al. (2006) e Billings et al. (2008). Os animais avaliados foram divididos de forma randomizada em sete grupos com n=7. Foram os grupos controle: Controle negativo (CN) que recebeu apenas água durante o tratamento; *E. edulis* 400 mg/kg (EE 400WT) tratado com polpa e não submetido a NIC; Nefropatia por contraste (NIC) tratado previamente com água e grupo controle positivo N- acetilcisteína 100 mg/kg + NIC (NAC). Grupos tratados polpa: *E. edulis* 100 mg/kg + NIC (EE100); *E. edulis* 200 mg/kg + NIC (EE200) e *E. edulis* 400 mg/kg + NIC (EE400).

2.7. Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine (AOPP)

Ditirosina contendo produtos de proteínas de ligação cruzada, designado como AOPP, são produtos de ácido hipocloroso (HClO) induzidos pela cloração de aminas. O AOPP foi avaliado como descrito por Witko-Sarsat et al. (1996), com modificações. Foram utilizados na proporção de 200 mg de tecido renal para 1 ml de PBS. Após homogeneização foram centrifugados e o sobrenadante separado para utilização como fonte proteica. Para curva, foi adicionado solução de Cloramina T (0 a 100 $\mu\text{mol/L}$), colocados em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, EUA), seguido de 10 μL de 1,16 mol/L de iodeto de potássio (KI) e 20 μL de ácido acético glacial. A absorbância da mistura de reação foi imediatamente lida no comprimento de onda de 340 nm contrastado por um branco contendo 200 μL de PBS, 10 μL de KI e 20 μL de ácido acético. A absorbância de Cloramina T no comprimento de onda de 340 nm foi linear dentro do intervalo de 0 a 100 $\mu\text{mol/L}$ (Equação da reta: $y = 0,1228x + 0,1658$ com $R^2 = 0,98$). O AOPP foi determinado quando o coeficiente de correlação foi maior que 0.95. As concentrações foram expressas em $\mu\text{mol/mg}$ total de proteína, previamente quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), Equação da reta: $y = 0,6491x + 0,0118$ com $R^2 = 0,98$.

2.8. Determinação de toxicidade aguda (DL 50)

A toxicidade oral aguda foi realizada empregando-se o protocolo 423 preconizado pela OECD-423/2001 "Toxicidade Aguda de Classe" (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo. Para o presente estudo foi administrado diretamente a dose máxima do protocolo, 2000 mg/kg de polpa liofilizada de *E. edulis* (por gavagem em dose única) ao grupo tratado e água purificada ao grupo controle, definida a partir de dados de estudos prévios com outras espécies desta planta (Ribeiro et al. 2007). Para cada grupo foram utilizados três camundongos Swiss fêmeas, nulíparas e não grávidas, pesando entre 20 e 35 g. Então, foi estimada a categoria toxicológica, segundo as especificações do protocolo em experimento realizado em duplicata.

2.9. Análise histológica

Para o exame histopatológico, os rins foram conservados em formol a 10% e fígado em solução fixadora de Bouin. As amostras foram mantidas em álcool 70% até preparação do corte histológico e então contrastadas com hematoxilina, eosina (HE). Os tecidos foram incluídos em parafina e seccionados a 4 mm (Tolosa et al, 2003).

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, de forma qualitativa, por um médico patologista experiente. Todos os cortes foram examinados de um modo cego (Billings et al. 2008).

2.10. Análise estatística

Os valores da avaliação biológica foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média (EPM) e os valores da avaliação química como média $\pm$ desvio padrão (DP), submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de teste post-hoc de Tukey, com $p < 0,05$. O coeficiente de correlação das curvas padrão foi obtido através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os dados foram ainda submetidos à ANOVA, no LC de 95% e grau de liberdade $n-1$. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através da divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas de calibração do ensaio. Foram empregados os softwares Excel (Microsoft office 2010) e Prism software (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da capacidade antioxidante de polpa de *E. edulis*

Pela classificação de Scherer e Godoy (2009), para o método de DPPH, o índice de atividade antioxidante (AAI) para a polpa de *E. edulis* foi de 3,4 e Cl_{50} de 11,4 $\mu\text{g/mL}$. O ácido ferrúlico apresentou AAI 5,49 e a $Cl_{50} = 7,12 \mu\text{g/mL}$, em ensaio com $R^2 = 0,994$.

A capacidade antioxidante dos compostos testados na inibição do radical cátion ABTS ficou estabelecida na seguinte ordem: Quercetina ($0,16 \pm 0,005 \text{ mg/mL}$) > TBHQ ($0,25 \pm 0,005 \text{ mg/mL}$) > BHT ($0,44 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$) > Polpa *E. edulis* ($0,59 \pm 0,03 \text{ mg/mL}$).

3.2. Quantificação de Polifenóis e antocianinas totais

O teor de polifenóis totais foram de *E. edulis* liofilizada ($811 \pm 16,7 \text{ mg EAG/g}$), e no presente estudo, a quantificação de antocianinas monoméricas pelo método pH diferencial foi de $181, 25 \pm 5,36 \text{ C3G mg/100 g}$.

3.3 Avaliação in vivo da atividade nefroprotetora da polpa de *E. edulis* pela dosagem de creatinina e uréia.

O presente estudo é o primeiro relato para investigar os efeitos da polpa de *E. edulis*, tanto na função e estrutura renal sobre o estresse oxidativo em nefrotoxicidade induzida por contraste radiológico em camundongos.

Neste experimento, os valores séricos da dosagem de creatinina de animais do grupo NIC ($0,60 \pm 0,14 \text{ mg/dl}$), diferenciaram-se do grupo Controle ($0,14 \pm 0,01 \text{ mg/dl}$), elevando a creatinina superior a 25%. Não houve diferença entre os grupos Controle ($0,14 \pm 0,01 \text{ mg/dl}$) e controle *E. edulis* 400 mg/kg ($0,17 \pm 0,0 \text{ mg/dl}$). Animais tratados com polpa de *E. edulis* nas concentrações de 100 mg/kg ($0,27 \pm 0,02 \text{ mg/dl}$), 200 mg/dl ($0,34 \pm 0,10 \text{ mg/dl}$) e 400 mg/dl ($0,38 \pm 0,09 \text{ mg/dl}$), apresentaram dosagem de creatinina próximas aos animais controle ($0,14 \pm 0,01 \text{ mg/dl}$) e grupo tratado com N-acetilcisteína ($0,1 \pm 0,00 \text{ mg/dl}$). Porém, não apresentaram diferença ao grupo NIC ($0,60 \pm 0,14 \text{ mg/dl}$) (Figura 1).

Os valores séricos de uréia em animais que receberam a polpa de *E. edulis* 100 mg/kg ($93 \pm 9,6$ mg/dl) precedendo a nefropatia de contraste, foi semelhante aos animais do grupo Controle ($71 \pm 2,8$ mg/dl). A polpa de *E. edulis* 100 mg/kg apresentou proteção renal superior ao tratamento com N-acetilcisteína ($226 \pm 9,3$ mg/dl), que após indução da nefropatia alcançou valores de uréia semelhantes ao grupo NIC (256 ± 21 mg/dl). As dosagens mais altas da polpa de *E. edulis*, 200mg/dl (237 ± 48 mg/dl) e 400 mg/dl (323 ± 40 mg/dl), não se diferenciaram do grupo NIC (Figura 2).

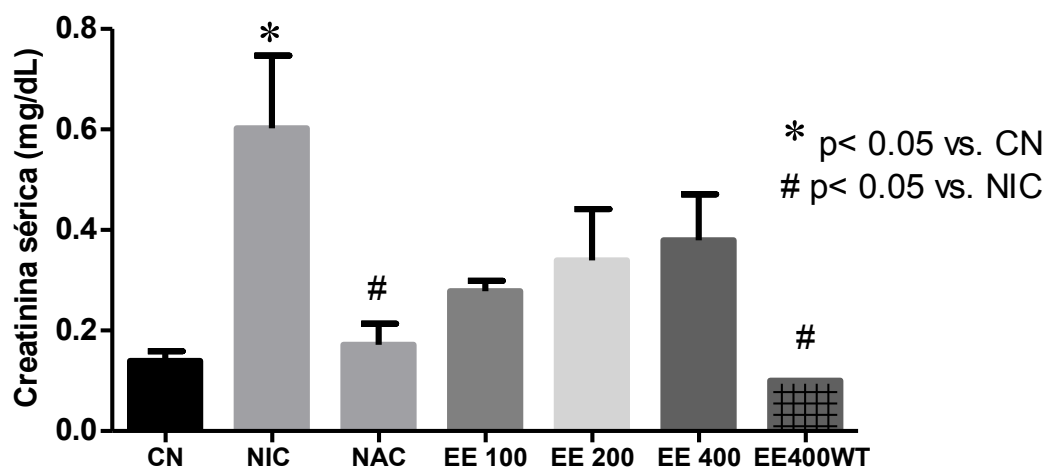


Figura 1: Dosagem sérica de creatinina em camundongos tratados por 5 dias antes da NIC. Grupos: (CN) Controle negativo, Nefropatia por contraste (NIC), N-acetilcisteína 100 mg/kg (NAC), *E. edulis* 100 mg/kg + NIC (EE100), *E. edulis* 200 mg/kg + NIC (EE200), *E. edulis* 400 mg/kg + NIC (EE400) e controle *E. edulis* 400 mg/kg (EE400WT).

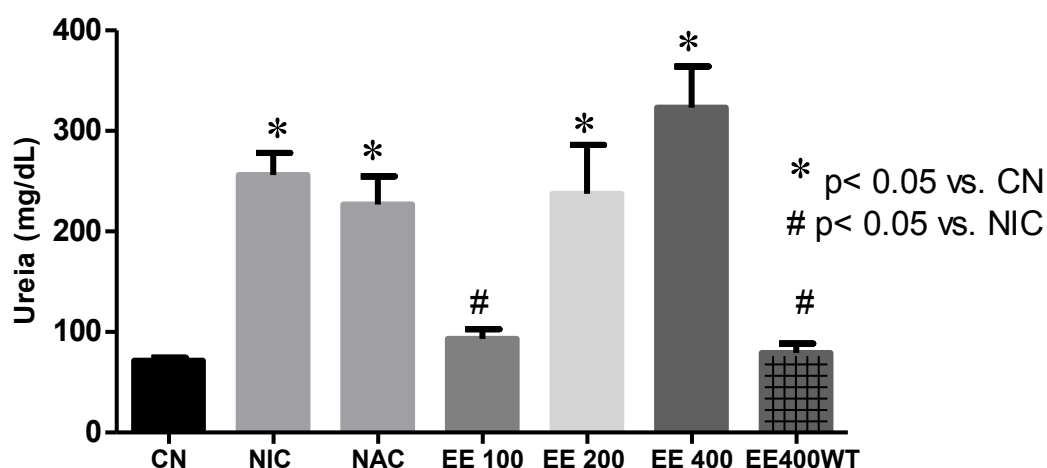


Figura 2: Dosagem sérica de uréia em camundongos tratados por 5 dias antes da NIC. Grupos: (CN) Controle negativo, Nefropatia por contraste (NIC), N-acetilcisteína 100 mg/kg (NAC), *E. edulis* 100 mg/kg + NIC (EE100), *E. edulis* 200 mg/kg + NIC (EE200), *E. edulis* 400 mg/kg + NIC (EE400) e controle *E. edulis* 400 mg/kg (EE400WT).

3.4. Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine (AOPP)

No presente estudo, o processo de oxidação proteica de animais do grupo NIC ($0,27 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg}$) elevou-se, diferenciando-se do grupo Controle ($0,16 \pm 0,0 \mu\text{mol/mg}$). Animais tratados com polpa de *E. edulis* nas concentrações de 100 mg/kg ($0,21 \pm 0,02 \mu\text{mol/mg}$) e 200mg/dl ($0,27 \pm 0,09 \mu\text{mol/mg}$), apresentaram dosagem de AOPP próximas aos animais controle, semelhante ao grupo NAC, representando o tratamento convencional ($0,25 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg}$). Apenas o grupo tratado com *E. edulis* 400 mg ($0,35 \pm 0,07 \mu\text{mol/mg}$) apresentou elevação da oxidação proteica, diferenciando-os dos animais controle. O grupo que recebeu somente a polpa de *E. edulis* apresentou valores de AOPP iguais ao do grupo controle (Figura 3).

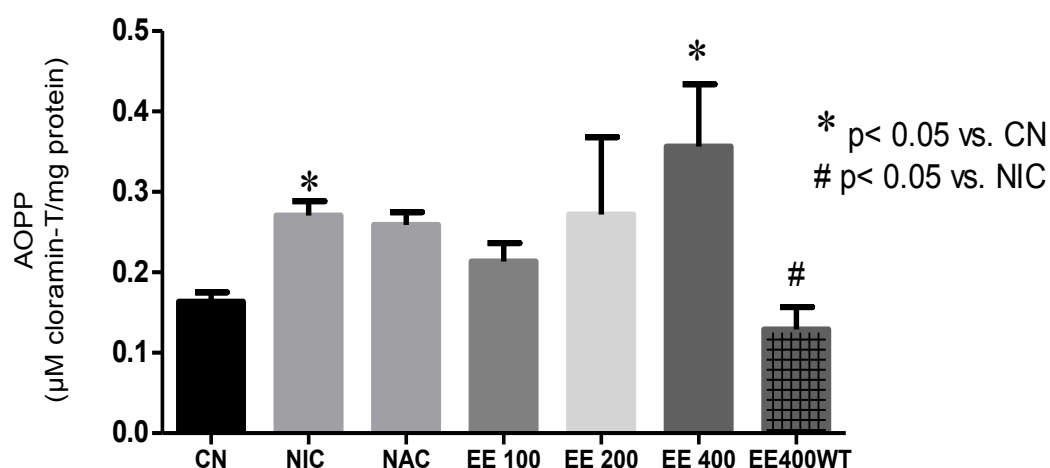


Figura 3: Dosagem de AOPP de camundongos tratados por 5 dias antes da NIC. Grupos: (CN) /Controle negativo, Nefropatia por contraste (NIC), N- acetilcisteína 100 mg/kg (NAC), *E. edulis* 100 mg/kg + NIC (EE100), *E. edulis* 200 mg/kg + NIC (EE200), *E. edulis* 400 mg/kg + NIC (EE400) e controle *E. edulis* 400 mg/kg (EE400WT).

3.5. Análise histológica

A análise histológica dos rins coletados de animais do grupo NIC apresentaram degeneração vacuolar e vacuolização cortical (Figura 4 B, I e P). Essas lesões não foram observadas em nenhuma lâmina do grupo CN (Figura 4 A, H, O) ou EE400WT (Figura 4 D, K, R), onde as células renais apresentaram-se arquitetura renal preservada.

Os animais que receberam polpa de *E. edulis* 100 mg/kg (Figura 4 E, L, S) e N- acetilcisteína (Figura 4 C, J, Q) apresentaram estruturas celulares renais melhor preservadas, com aspecto tubular e glomerular normais, sem nenhum achado patológico. Porém, a toxicidade causada pelo contraste iodato foi aumentada em animais que receberam polpa de *E. edulis* 200 mg/kg (Figura 4 F, M, T) e 400 mg/kg (Figura 4 G, N, U). Nestas lâminas, foram observadas vacuolização, degeneração vacuolar de grau discreto a intenso, presença de infiltrado perivascular e inflamatório, além de dilatação do túbulo proximal (Figura 4).

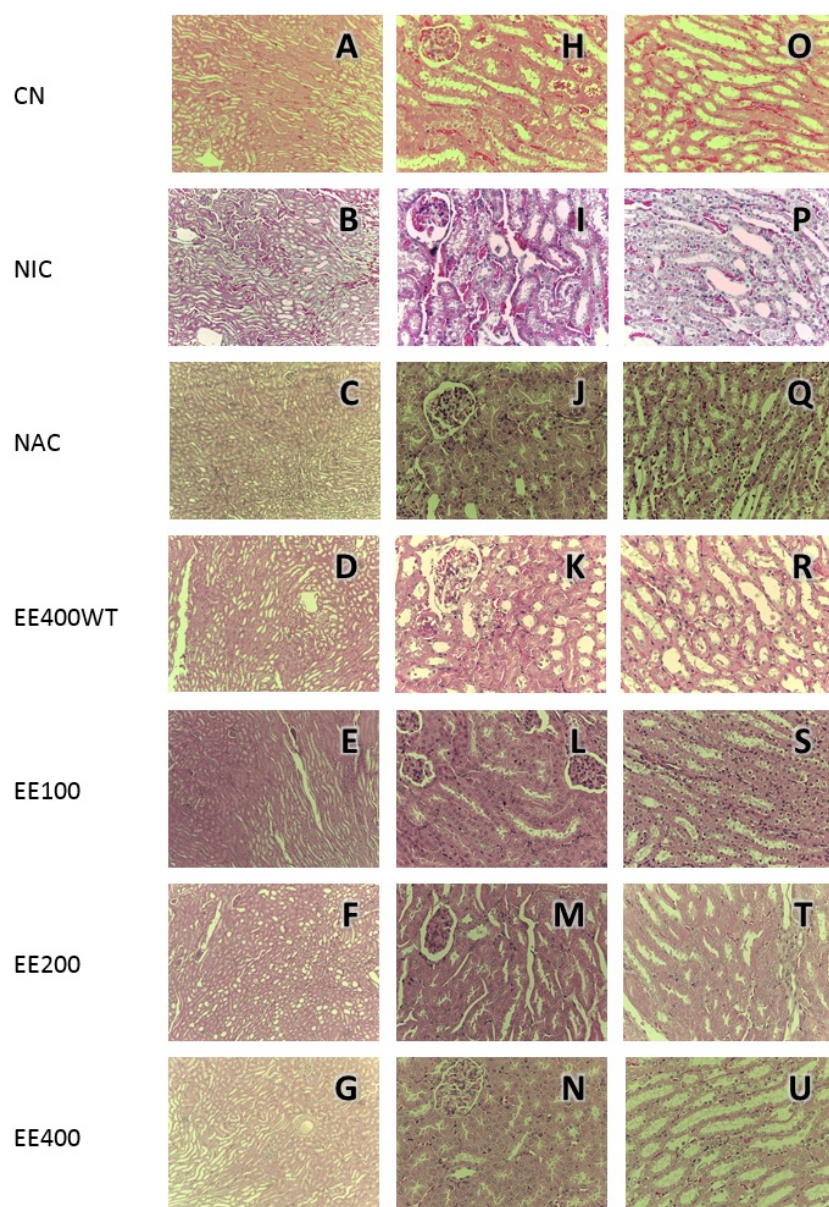


Figura 4: Micrografias representativas mostrando a histologia renal nos grupos de camundongos após NIC. Grupos: (CN) Controle, Nefropatia por contraste (NIC), N-acetilcisteína 100 mg/kg (NAC), *E. edulis* 100 mg/kg + NIC (EE100), *E. edulis* 200 mg/kg + NIC (EE200), *E. edulis* 400 mg/kg + NIC (EE400) e controle *E. edulis* 400 mg/kg (EE400WT). Imagens A a G: seção córtex-medula (100x), demonstrando alterações na arquitetura típica renal; Imagens H a N: região cortical (400x) e imagens O a U: região medula (400 x) mostrando lesões tubulointersticiais.

3.6. Determinação de toxicidade aguda (DL 50)

Diante dos resultados obtidos nas análises bioquímicas do presente estudo, que demonstraram que a polpa de *E. edulis* não apresenta efeitos tóxicos em dosagem inferior a 400 mg/kg na ausência de radiocontraste, iniciamos o protocolo de DL 50 com a dose de 2000 mg/kg. Entre os grupos avaliados, não foi verificada morbidade ou mortalidade, o que determina a toxicidade oral aguda da polpa de *E. edulis* com dose superior a 2000 mg/kg, classificando-a como categoria 5, segundo os critérios do protocolo experimental adotado (OECD, 2001). Na análise histológica dos tecidos renais e hepáticos não foram observados achados patológicos, em ambos os órgãos as células apresentaram-se com arquitetura preservada.

Os resultados bioquímicos no doseamento de marcadores de função renal e hepática não apresentaram diferença entre os grupos tratado com polpa de *E. edulis* e controle, exceto nos parâmetros de creatinina (Tabela 1).

TABELA I: Resultados bioquímicos de função renal e hepática de toxicidade aguda de animais tratados com 2.000 mg/kg de polpa de *E. edulis* (T) e grupo controle (C).

Marcadores bioquímicos	Grupos	Média (mg/dL) $\pm$ Erro Padrão
<i>AST</i>	C	239 $\pm$ 67,5
	T	204 $\pm$ 34,5
<i>FA</i>	C	176 $\pm$ 44,7
	T	89,2 $\pm$ 10,3
<i>GGT</i>	C	3,83 $\pm$ 0,87
	T	2,6 $\pm$ 0,67
<i>Uréia</i>	C	41,1 $\pm$ 1,93
	T	49,6 $\pm$ 5,75
<i>Creatinina</i>	C	0,23 $\pm$ 0,03
	T	0,36 $\pm$ 0,03 *
<i>Proteínas Totais</i>	C	5,51 $\pm$ 0,44
	T	5,16 $\pm$ 0,36
<i>Albumina</i>	C	1,93 $\pm$ 0,11
	T	3,12 $\pm$ 1,2

4. DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da capacidade antioxidante de polpa de *E. edulis*

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, efeito protetor renal de polpa de *E. edulis*, envolvendo o efeito antioxidante de substâncias polifenólicas como possível mecanismo de ação e resultando em diminuição da disfunção renal e lesões tubulares morfológicas em camundongos após indução de nefropatia de contraste.

A fruta *E. edulis* é considerada uma fonte de polifenóis e antocianinas e a atividade antioxidante foi anteriormente discutida por diversos autores e diretamente associada à quantidade desses compostos presentes na composição química de extratos e polpa de frutas (Vedana et al. 2008; Silva et al. 2010; Koolen et al. 2013; Silva et al. 2013)

Pelo método DPPH, os resultados de AAI (3,4) muito forte e CI50 (11,4 µg/mL), sugerem que a polpa do *E. edulis* possui atividade antioxidante nas condições usadas neste experimento, inclusive próximos aos valores encontrados nesta pesquisa para o padrão ácido ferrúlico (AAI 5,49 e CI50 = 7,12 µg/mL), demonstrando o potencial antioxidante do *E. edulis*.

Pelo método de ABTS, a CI50 da polpa *E. edulis* foi comparada com as concentrações obtidas para as soluções padrões (BHT, TBHQ e quercetina) todas apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), considerando que maior será o potencial antioxidante de um produto quanto menor for sua concentração necessária para a inibição dos radicais livres (Stajčić et al. 2012). Destaca-se que a polpa de *E. edulis* por ser um produto não concentrado, proveniente da parte comestível do fruto, a CI50 observada pode ser considerada próxima às obtidas para os antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ e quercetina, que são compostos isolados e utilizados por sua conhecida atividade antioxidante (Hollman et al. 1997; Wang et al. 2008; Scherer e Godoy, 2009).

4.2. Quantificação de polifenóis e antocianinas totais

A atividade antioxidante deste experimento pode estar relacionada ao alto conteúdo de polifenóis totais encontrado para polpa de *E. edulis* liofilizada ($811 \pm 16,7$ mg EAG/g). Borges et al. (2011b) relataram para a polpa fresca de *E. edulis* valores variando entre 303,63 e 806,37 mg EAG/g, aplicando variáveis na extração da polpa. Bicudo et al (2014) realizaram experimentos com o fruto *E. edulis* coletado em diferentes fases de maturação e relataram concentrações de polifenóis totais que variaram entre 49,09 e 81,69 mg EAG/g, bem inferiores ao deste experimento. Sabe-se que o conteúdo de polifenóis na polpa de *E. edulis* é altamente influenciada por fatores ambientais, climáticos e maturação dos frutos (Borges et al. 2011a; Bicudo, Ribani e Beta, 2014), tempo de extração e solventes utilizados (Borges et al. 2011b).

Outros estudos também relataram teores de antocianinas próximos à faixa de concentração observada para fruto do palmitero *E. edulis*. Ribeiro et al. (2011) relataram conteúdo de 183,7 mg/100g de antocianinas para frutos coletados no estado do Rio de Janeiro (Brasil). Borges et al. (2011a) relataram valores entre 14,84 a 409,85 mg/100 g de antocianinas, para frutos coletados no estado de Santa Catarina (Brasil) em diferentes regiões e condições climáticas. Brito et al. (2007) determinaram o teor de 290 mg/100g de frutos coletados no estado de São Paulo (Brasil). Foi observado por Borges et al. (2011a) que palmeiras cultivadas nos meses de verão, em período comum de frutificação e sob média altitude, possuem conteúdo de antocianinas superior a frutas de outras regiões, concluindo que maior incidência de radiação solar sobre a fruta tem efeito positivo na síntese de antocianinas, e a intensidade solar afeta o metabolismo e síntese de flavonóides em geral, promovendo maior acúmulo de antocianinas. Os frutos de *E. edulis* usadas nesta pesquisa foram cultivadas a 70 m de altitude, coletados no período de inverno brasileiro (mês de agosto), fato que poderia explicar o conteúdo de antocianinas.

4.3. Avaliação *in vivo* da atividade nefroprotetora da polpa de *E. edulis* pela dosagem de creatinina e uréia.

No presente estudo, foi utilizado nos camundongos meio de contraste na dosagem compatível com o uso clínico (1,5 g / kg de iodo na prática angiográfica de rotina), adicionou-se à inibição das prostaglandinas e NO-síntese, que simula situações clínicas que predispõem para NIC, aumentando estresse oxidativo e

consequente hipóxia medular e, finalmente, leva a uma diminuição da função renal (Itoh et al. 2005; Lee et al. 2006; Kongkham et al. 2013). Contudo, observando a dosagem de creatinina e uréia do grupo NIC e grupo CN, constatou-se que houve azotemia com significativa elevação desses compostos nitrogenados (Figura 1 e 2). Outras pesquisas também relataram em modelo experimental de NIC elevação dos valores séricos de creatinina $\geq 25\%$ em ratos e camundongos (Billings, et al. 2008; Lee et al. 2006; Itoh et al. 2005; Machado et al. 2003; Yuen et al. 2004). Não se observou diferença entre a dosagem de creatinina e uréia sérica do grupo CN e o grupo EE400WT, indicando que em condições não patológicas a polpa de *E. edulis* não induz a nefropatia.

Os animais do grupo EE100, EE200 e EE400, apresentaram dosagem de creatinina sérica igual ao grupo CN e grupo NAC (Figura 1). Visto que a indução causou ao grupo NIC elevação de creatinina superior a 25% do valor basal, esses dados demonstram que apesar dos grupos tratados com polpa de *E. edulis* não se diferenciarem do grupo NIC, existe uma tendência a proteção renal com possível redução de danos sobre a filtração glomerular. No entanto, nessas condições experimentais, o grupo tratado com N-acetilcisteína, que configura o esquema profilático adotado na atualidade apresentou melhores resultados (Pattharanitima e Tasanarong, 2014; McCullough e Akrawinthawong, 2013).

A uréia também foi analisada (Figura 2). Os valores séricos de uréia em animais que receberam a polpa de *E. edulis* 100 mg/kg, sugerem que a *E. edulis* promoveu proteção renal a algum mecanismo deletério sobre a filtração glomerular após a indução. Os animais tratados com polpa 100 mg/kg apresentaram dosagem de uréia inferior ao grupo NAC, que curiosamente alcançou valores deste marcador semelhante ao grupo NIC. Em estudo sobre a importância da uréia no diagnóstico diferencial de insuficiência renal aguda, Carvounis et al. (2002) afirmam que associada à creatinina o aumento repentino da concentração sérica uréia é um critério para diagnóstico de lesão renal aguda. Os grupos EE200 e EE400, não se diferenciaram do grupo NIC, e descartariam um possível efeito protetor em doses elevadas da polpa.

4.4. Produtos de proteína cross-linking contendo Dityrosine (AOPP)

Na análise de AOPP foi evidenciado o estresse oxidativo no tecido renal de animais induzidos a nefropatia de contraste (Figura 3). O AOPP é gerado através da ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos, pela ação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas (Witko- Sarsat et al. 1996; Kalowsová, Skrha e Zima, 2002). Esses oxidantes são produzidos pelas mieloperoxidases liberadas pelos neutrófilos ativados, através de um desequilíbrio nos mecanismos antioxidantes, como consequência, esses radicais livres agem sobre as proteínas produzindo Dityrosine (Piowowar, 2010).

Os animais submetidos à nefropatia, previamente tratados com as menores doses da polpa de *E. edulis* apresentaram AOPP semelhante aos animais do grupo controle. Esses dados reforçam o fato que houve proteção aos animais, visto que a nefropatia por contraste causou no grupo NIC significativa elevação de produtos de oxidação avançada de proteínas. Contudo, o grupo EE400 apresentou acentuada elevação de AOPP, sugerindo que nesta dosagem não houve proteção renal e levanta a suspeita de um possível efeito sinérgico pró oxidante em altas doses da *E. edulis*.

A avaliação de AOPP deste experimento vem confirmar que, apesar dos animais tratados com doses menores de *E. edulis* não se diferenciarem do grupo NIC, a polpa de *E. edulis* apresenta tendência a proteção renal em animais induzidos a nefropatia de contraste, através da atividade antioxidante conferida por seus polifenóis.

4.5. Análise histológica

Na micrografia representativa mostrando a histologia renal dos diferentes grupos de camundongos (Figura 4), é possível observar que animais do grupo NIC apresentaram lesões típicas de nefropatia por contraste em células tubulares proximais. Alterações patológicas como degeneração vacuolar, vacuolização cortical e balonização, também foram descritas por Lee et al. (2006) e Yokomaku et al. (2008) em pesquisas com indução de nefropatia em ratos. Portanto, somados aos parâmetros bioquímicos, nossos dados histopatológicos indicam uma perturbação significativa da estrutura renal no grupo NIC em comparação com os animais de

controle, de acordo com outras pesquisas (Billings et al. 2008; Yokomaku et al. 2008; Khan et al. 2013).

Neste experimento, não foi observado necrose tubular, como descrita por Yokomaku et al. (2008) e Billings et al. (2008), porém partindo do pressuposto de que a nefropatia pode ocorrer dentro do período de 24-72 horas (Andreucci et al. 2014) pode-se inferir que na presente pesquisa, no ato de eutanásia dos animais que foi realizado com 24 horas, não houve tempo hábil para que a isquemia causasse lesões irreversíveis tais como necrose tubular aguda, causando apenas degeneração vacuolar.

São descritos dois mecanismos pelos quais o contraste iodado induz a nefropatia: lesão por isquemia e dano tubular direto. Ambos os mecanismos levam à diminuição da taxa de filtração glomerular, indicando a instalação da lesão renal aguda (LRA) (Caiazza, et al. 2013). Na lesão isquêmica, a vasoconstrição gerada leva a subsequente hipóxia, causando lesão endotelial com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que por sua vez lesionam diretamente os túbulos renais e também o endotélio vascular. As EROs podem, ainda, reagir com o óxido nítrico presente no endotélio, e formar o peroxinitrito, um oxidante com alta capacidade lesiva. O dano tubular direto se dá pelo depósito do contraste nos túbulos renais, levando a citotoxicidade (Andreucci et al. 2014). Segundo Bucher et al. (2014), o aumento da osmolaridade induzida pelo contraste é um fato secundário para a ocorrência de vacuolização no citoplasma das células tubulares proximais e Carraro et al. (1998) afirma que a vacuolização citoplasmática vista nas células tubulares proximais é devida à citotoxicidade gerada pelo contraste iodado.

A análise histológica dos rins coletados nos grupos EE100 e NAC, demonstraram estruturas celulares melhor preservadas, podendo sugerir que além do tratamento com N- acetilcisteína, a polpa de *E. edulis* rica em polifenóis na concentração de 100 mg/kg oferece proteção ao tecido renal, capaz de combater radicais livres gerados pelo stress oxidativo em quadro de nefropatia de contraste. Sabe-se que a juçara é rica em polifenóis (Paredes-López et al. 2010, Borges et al. 2011; Inacio et al. 2013; Bicudo, Ribani e Beta, 2014), e que estes compostos antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (Barreiros et al. 2006; Atoui et al. 2005). O aumento da toxicidade causada pelo contraste iodado em animais que receberam

doses mais altas da polpa, sugerem que em dose superior a 200 mg/kg a polpa de juçara perde seu efeito protetor ao tecido renal.

4.6. Determinação de toxicidade aguda (DL 50)

A toxicidade aguda foi estimada como maior que 2000 mg/kg e classificada como categoria 5, que representam relativamente baixo perigo de toxicidade aguda, segundo o protocolo OECD 423 (2011). Estes resultados indicam que existe uma margem de segurança para o uso da polpa de *E. edulis* como agente terapêutico, embora estudos toxicológicos adicionais sejam ainda necessários. A Toxicidade Aguda define-se com os efeitos adversos que ocorrem dentro de um curto período após a administração de dose única ou doses múltiplas, durante 24 horas (Oga, Camargo e Batistuzzo, 2008).

Como se pode observar na tabela I, não houve diferença entre o grupo controle e tratado *E. edulis* 2000 mg/kg pelos parâmetros bioquímicos de aspartato-aminotransferase (AST), que está presente nas mitocôndrias dos hepatócitos e sua alteração auxilia na diferenciação de uma suposta lesão (Motta, 2009), fosfatase alcalina (FA), onde suas alterações podem revelar algum tipo de obstrução na árvore biliar mediada por hepatócitos (Motta, 2009), gama-glutamyltranspeptidase (GGT), onde suas alterações podem indicar lesões hepatobiliares ou influência de medicações, álcool e algumas doenças (Araújo, et al. 2005), uréia, onde seus níveis sanguíneos podem auxiliar na avaliação de filtração glomerular (Motta, 2009), proteínas totais, sendo utilizado com parâmetro de diagnósticos sendo sensível indicativo de lesão ou proliferação celular (Motta, 2009; Costa, et al. 2012), e albumina, onde seu aumento sanguíneo pode revelar diminuição ou defeito em sua síntese devido a algum tipo de dano nas células hepáticas (Motta, 2009). Os níveis de creatinina revelaram diferença entre o grupo tratado e o controle, reforçando a suspeita de que em doses superiores a 400 mg/kg a polpa de *E. edulis* apresentaria um possível efeito pró oxidante.

5. CONCLUSÃO

Nas condições aplicadas a este experimento, concluímos que a polpa de *E. edulis*, em baixas dosagens, possui tendência ao efeito protetor na prevenção do desenvolvimento de disfunção renal em camundongos induzidos a nefropatia de contraste. No entanto, a N-acetilcisteína ainda apresentou melhores resultados. Além disso, a polpa de *E. edulis*, enriquecida em polifenóis destacando-se as antocianinas, diminuiu acentuadamente a incidência de lesões glomerulares e tubulares renais. Outros estudos se fazem necessários para melhor elucidar sobre a eficácia da polpa de *E. edulis* na prevenção da NIC.

AGRADECIMENTOS

A FAPES agradece-se pelo financiamento de bolsas e financiamento do estudo. Agradece-se ao Laboratório de Saneamento (UFES) e Instituto Tommasi pela utilização de equipamentos. À UVV pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREUCCI, M; FAGA, T; PISANI, A; SABBATINI, M; MICHAEL, A. Acute Kidney Injury by Radiographic Contrast Media: Pathogenesis and Prevention. **Biomed Research International**. v. 2014, p. 1-21. 2014.
- ARAÚJO, L M B; LIMA, D S; DALTRO, C. Associação da Gama-Glutamil Transferase e a Síndrome Metabólica em Mulheres Obesas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 49, n 4, p. 557-562. 2005.
- ATOUI, A K; MANSOURI, A; BOSKOU, G; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**. v. 89, p. 27-36. 2005
- BARREIROS, A L B S; DAVID, J P; DAVID, J M. Extresse Oxidativo: Relação Entre Espécies Reativas de Oxigênio e a Defesa do Organismo. **Química Nova**. v. 29, p. 113-126. 2006.
- BARRETT, B J; PARFREY, P S. Clinical practice. Preventing nephropathy induced by contrast medium. **New England Journal of Medicine**. v. 354, n. 4, p. 379-386. Jan, 2006.
- BICUDO, M O; RIBANI, RH; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of Juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 69, n. 2, p. 142-147. Jun. 2014.
- BILLINGS IV; F T, CHEN, S W; KIM, M; PARK, S W; SONG, J H; WANG, S; HERMAN, J; D'AGATI, V; LEE, H T. Alpha2-Adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. **American Journal Of Physiology: Renal Physiology**. v. 295, n. 3, p. 741 – 748. Set. 2008.
- BORGES, G S C; VIEIRA, F G K; COPETTI, C; GONZAGA, L V; ZAMBIASE, R C; FILHO, J M. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in Southern Brazil. **Food Research International**. v. 44, n. 7, p. 2128-2133. 2011a.
- BORGES, G S C; VIEIRA, F G K; COPETTI, C; GONZAGA, L V; FETT, R. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International**. v. 44, n. 3, p. 708-715. 2011 b.
- BRITO, E S de; ARAÚJO, M C P de; ALVES, R E; CARKEET, C C; CLEVIDENCE, B; NOVOTNY, J. **Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara e guarabiju**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 23, p. 9389-9394. Out. 2007.
- BUCHER, A M; CECCO, C N de; SCHOEPP, U J; MEINEL, F G; KRAZINSKI, A W; SPEARMAN, J V; MCQUISTON, A D; WANG, R; BUCHER, J; VOGL, T J; KATZBERG, R W. Is Contrast Medium Osmolality a Causal Factor for Contrast-Induced Nephropathy? **Biomed Research International**. v. 2014, p. 1-8. Fev. 2014.

CAIAZZA, A; RUSSO, L; SABBATINI, M; RUSSO, D. Hemodynamic and Tubular Changes Induced by Contrast Media. **Biomed Research International**. v. 2014, p. 1-7. Dez. 2013.

CARRARO, M; MALALAN, F; ANTONIONE, R; STACUL, F; COVA, M; PETZ, S; ASSANTE, M; GRYNNE, B; HAIDER, T; PALMA, L D; FACCINI, L. Effects of a dimeric versus a monomeric nonionic contrast medium on renal function in patients with mild to moderate renal insufficiency: a double-blind, randomized clinical trial. **European Radiology**. v. 8, n. 1, p. 144-147. 1998.

CARVOUNIS CHRISTOS P, NISAR SABEEHA, GURO-RAZUMAN SAMERAH. Significance of the fractional excretion of urea in the differential diagnosis of acute renal failure. **Kidney International**. v. 62, p. 2223–2229. 2002.

COSTA, J P; LOURENÇO, N V; SANTOS, C C M P S; TOMÉ, A R; SOUSA, G F; SOUSA, D P; ALMEIDA, R N; FREITAS, R M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Aplicadas**. v. 33, n 3, p. 421-428. 2012.

ERLEY, C M; HEYNE, N; BURGERT, K; LANGANKE, J; RISLER, T; OSSWALD, H. Prevention of radiocontrast- induced nephropathy by adenosine antagonists rats with chronic nitric oxide deficiency. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 8, n. 7, p. 1125-1132. Jul. 1997.

GIUSTI, M M; WROLSTAD, R E. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R E. **Current protocols in food analytical chemistry**. John Wiley & Sons, New York. p. 1.2.1-13. 2001.

GOMES, I B; PORTO, M L; SANTOS, M C, CAMPAGNARO, B P, PEREIRA, T M, MEYRELLES, S S, VASQUEZ, E C. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. **Lipids In Health And Disease**. v. 13, N. 184, p. 1-10. 2014.

HEYMAN, S N; ROSEN, S; KHAMAISI, M; IDÉE, J M; ROSENBERGER, C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. **Investigative Radiology**. v. 45, n. 4, p. 188-195. Abr. 2010.

HOLLMAN, P C; VAN TRIJP, J M; BUYSMAN, M N; VAN DER GAAG, M S; MENGELERS, M J; DE VRIES, J H; KATAN, M B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Letters**. v. 418, n. 1-2, p. 152-156. Nov.1997.

INÁCIO, M R C; LIMA, K M G; LOPES, V G; PESSOA, J D C; TEIXEIRA, G H A. Total anthocyanin content determination in intact açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis Mart.*) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**. v.136, n.3-4, p.1160-1164. 2013.

INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), Desenvolvimento da Fruticultura. **Revista Incaper**. 2010.

ITOH, Y; YANO, T; SENDO, T; OISHI, R. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 97, n. 4, p. 473-488.2005.

KALOUSOVÁ, M; SKRHA, J; ZIMA T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiological research**. v.51 n.2 p. 597-604. 2002.

KHAN, A M; MADERDRUT, J L; LI; TOLIVER, H L; COY, D H; SIMON, E E; BATUMAN, V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents contrast-induced nephropathy in a novel mouse model. **Physiological reports**. v. 1, n. 6, p. 1-14. Nov. 2013.

KONGKHAM, S; SRIWONG, S; TASANARONG, A. Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats. **Nefrologia**. v.18, n. 33(1), p.116-123. Jan 2013.

KOOLEN, H F H; SILVA, M A F; GOZZO, C F; SOUZA, Q A; SOUZA, D L A. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**. v. 51, n. 2, p. 467–473. Maio 2013.

LEE, H T; JAN, M; BAE, S C; JOO, J D; GOUBAEVA, F R; YANG, J; KIM, M. A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**. v. 290, n. 6, p. 1367-1375. Jun. 2006.

LEE, J; KOO, N; MIN, D B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.3, p.21–33. 2004

LUZIA, D M M; JORGE, N. Study of antioxidant activity of non-conventional Brazilian fruits. **Journal of Food Science and Technology**. v. 51, n 6, p. 1167-1172. 2011.

MACHADO, C M; CASTAGNA, M T V; REIS, G; MOTTAL, M S; OLIVEIRA, J V; OLIVEIRA, A L; CAMPOS NETO, M S. Nefropatia por Radiocontraste: Tendências Atuais. **Rev. Brasileira de Cardiologia Invasiva**. v. 11, n 4, p. 27-30. 2003.

MAGRO, M C S; VATTIMO, M F F. Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores. **Revista Brasileira de terapia intensiva**.v.19, n.2, p. 182-185. 2007.

MANTOVANI, A; MORELLATO, L P C, Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmitero. p. 23-38.In: REIS, M S; REIS, A. *Euterpe edulis* Martius (palmitero): biologia, conservação e manejo. **Herbário Barbosa Rodrigues**. Itajaí, 335p. 2000

MARIANI, P M; FREITAS, P R; KALIL, I. C; BRASIL, G A; RONCHI, S. N., LENZ, D. Efectos quimiopreventivos y antimutagénicos in vivo del extracto hidroetanólico de frutos de *Carica papaya* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.18, n 3, p. 381-390. 2013.

MCCULLOUGH, P A; AKRAWINTHAWONG, K. Ascorbic acid for the prevention of contrast induced acute kidney injury. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 62, n. 23, p. 2176-2177. 2013.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações. 5ª ed. **MedBook**. Rio de Janeiro, p. 63-66, 69-72, 89-90, 96-97, 100-103, 228-229 e 231-232. 2009.

OECD **Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity- Acute Toxicity Class Method**, 423. Adopted 17th December, 2001.

OGA, S; CAMARGO, M M A; BATISTUZZO, J A O. Fundamentos da Toxicologia. 3ª ed. **Editora Atheneu**. São Paulo. 2008.

OSTHOFF, M; TRENDLENBURG, M. Impact of mannose-binding lectin deficiency on radiocontrast-induced renal dysfunction. **Biomed Research International**. p. 1-8. Nov. 2013.

PAREDES-LÓPEZ, O; CERVANTES-CEJA, M L; VIGNA-PÉREZ, M; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries:improving human health and healthy aging, and promoting quality life: a review. **Plant Foods For Human Nutrition**. v. 65, n. 3, p. 299-308. Set. 2010.

PATTHARANITIMA, P; TASANARONG, A. Pharmacological strategies to prevent contrast induced acute kidney injury. **Biomed Research International**. v. 2014, p. 1-21. Fev. 2014.

PIOWOWAR,A,Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism the formatio ncharacteristics andproperty. **Pol Merkur Lekarski**. V. 164 n.28, p. 9-166. Feb. 2010.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology e Medicine**. v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237. Maio, 1999.

RIBEIRO, E P; SERAVALLI, E A G. Química de Alimentos. 1ª Ed. São Paulo. **Ed. Edgard Blücher LTDA**. 184 p. 2004.

SANTOS, R O; MALVAR, B; SILVA, R; RAMALHO, V; PESSEGUEIRO, P; AMOEDO, M; ANICETO, J; PIRES, C. Contrast-induced nephropathy. **Acta Médica Portuguesa**. v. 24, n. 5, p. 809-820. 2011.

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

SILVA, G J F da; CONSTANT, P B L; FIGUEIREDO, R W de; MOURA, S M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**. v. 21, n. 3, p. 429-436. Set. 2010.

SILVA, P P M; CARMO, L F; SILVA, G M; SILVEIRA-DINIZ, M F; CASEMIRO, R C; SPOTO, M H F. Composition of juçara pulp. **Alimentos e Nutrição = Brazilian Journal of Food and Nutrition**. Araraquara, v.24, n.1, p. 7-13. Mar. 2013.

SOUSA, C M M; SILVA, H R; VIEIRA-JR, G M; AYRES, M C C; COSTA, C L S; ARAÚJO, S D. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v.30, n 2, p. 351-355. 2007.

STAJČIĆ, S M; TEPIĆ, A N; DJILAS, S M; ŠUMIĆ, Z M; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J M; ĆETKOVIĆ, G S; VULIĆ, J J; TUMBAS, V T. Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. **APTEFF Journal**. v. 43, p. 93-105. 2012.

TOLOSA, E M C; RODRIGUES, C J; BEHMER, O A; FREITAS-NETO, A G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. São Paulo. **Ed. Manole**. 331p. 2003.

VEDANA, M I S; ZIEMER, C; MIGUEL, O G; PORTELLA, A C; CANDIDO, M B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. v.19, n.2, p. 159-165. Jun. 2008.

WANG, J; ZHANG, Q; ZHANG, Z; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 42, n. 2, p. 127-132. Mar. 2008.

WITKO-SARSAT, V; FRIEDLANDER M; CAPEILLÈRE-BLANDIN, C; NGUYEN-KHOA, T; NGUYEN, AT; ZINGRAFF, J; JUNGERS, P; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**. v. 49, p. 1304-1313. 1996.

YOKOMAKU, Y; SUGIMOTO, T; KUME, S; ARAKI, S; ISSHIKI, K; CHIN-KANASAKI, M; SAKAGUCHI, M; NITTA, N; HANEDA, M; KOYA, D; UZU, T; KASHIWAGI, A. Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy. **Journal of The American Society of Nephrology**. v. 19, n. 2, p. 321-328. Fev. 2008.

YUEN, P S; DUNN, S R; MIYAJI, T; YASUDA, H; SHARMA, K; STAR, R A. A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**. v. 286, n. 6, 9 1116-1119. Fev. 2004.

ZAGER, R A; JOHNSON, A C; HANSON, S Y. Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. **Kidney International**. v. 64, n. 1, p. 128-139. Jul. 2003.

Nota: Referências bibliográficas formatada de acordo com periódico **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

APÊNDICE 1

Figuras 1 a 14: Imagens ampliadas de micrografias representativas mostrando a histologia renal dos grupos de camundongos após NIC. Imagens da região cortical (400x) e região medular (400 x), grupos (CN) Controle negativo, Nefropatia por contraste (NIC), N- acetilcisteína 100 mg/kg (NAC), *E. edulis* 100 mg/kg + NIC (EE100), *E. edulis* 200 mg/kg + NIC (EE200), *E. edulis* 400 mg/kg + NIC (EE400) e controle *E. edulis* 400 mg/kg (EE400WT).

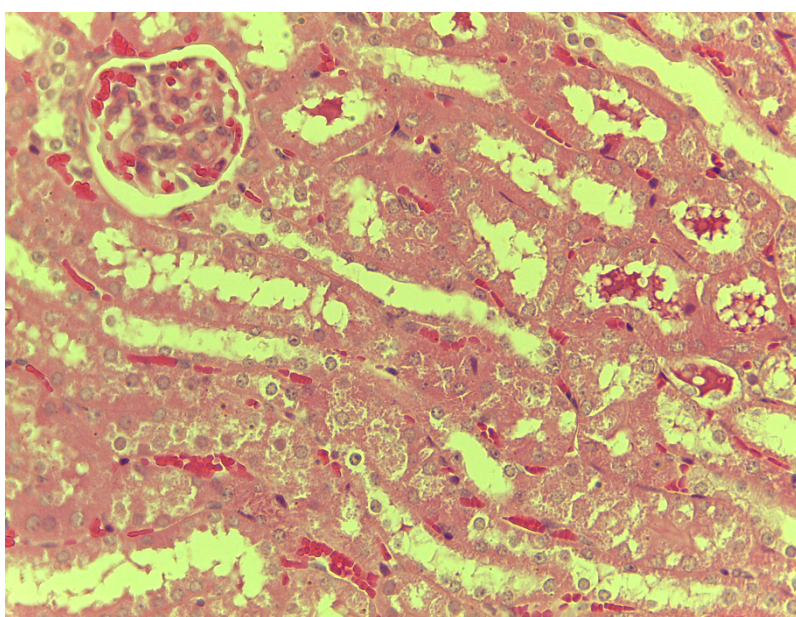


Figura 1: CN região cortical (400x)

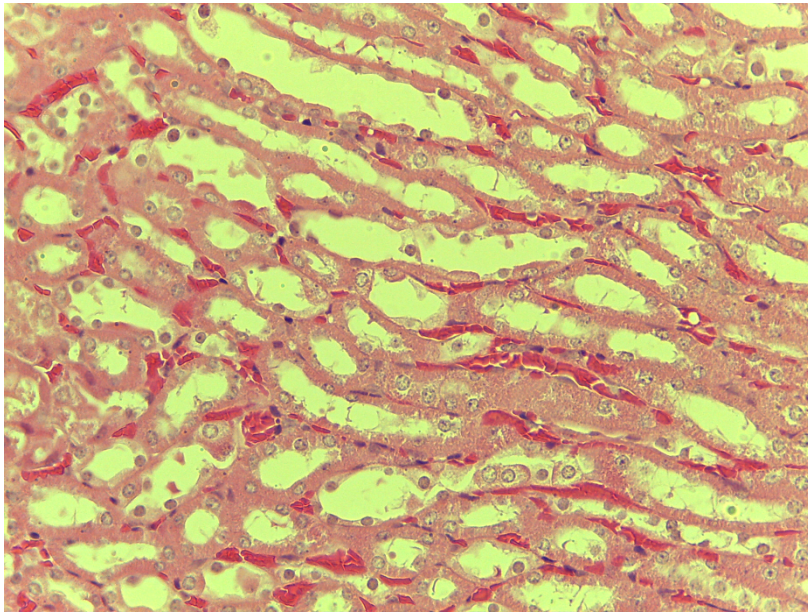


Figura 2: CN região medular (400x)

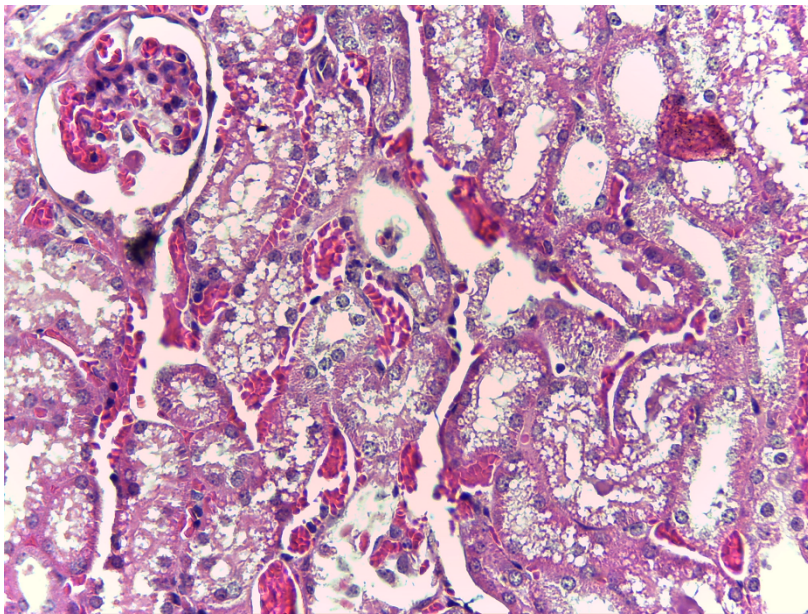


Figura 3: NIC região cortical (400x)

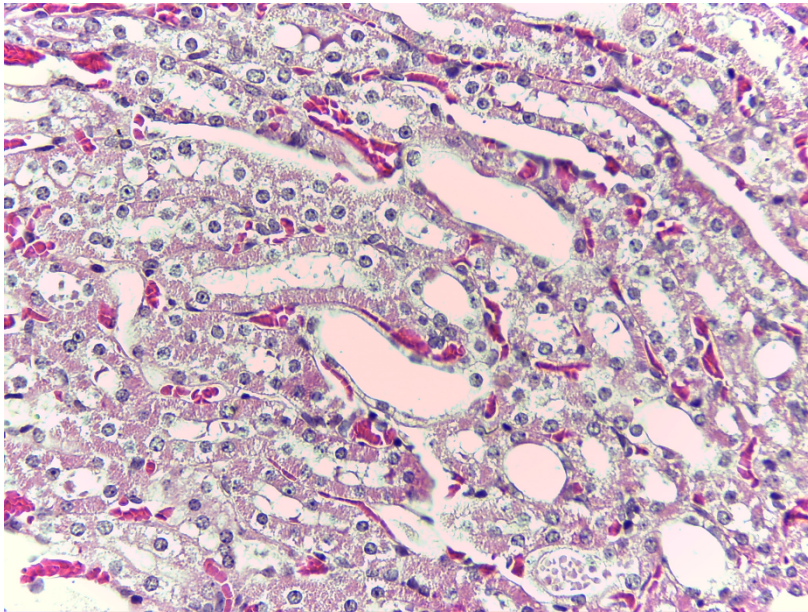


Figura 4: NIC região medular (400x)

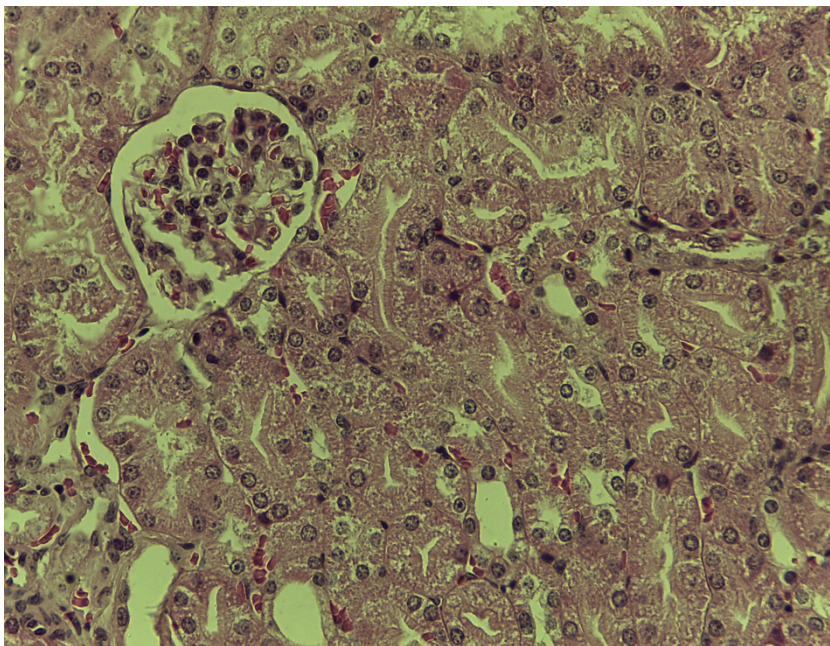


Figura 5: NAC região cortical (400x)

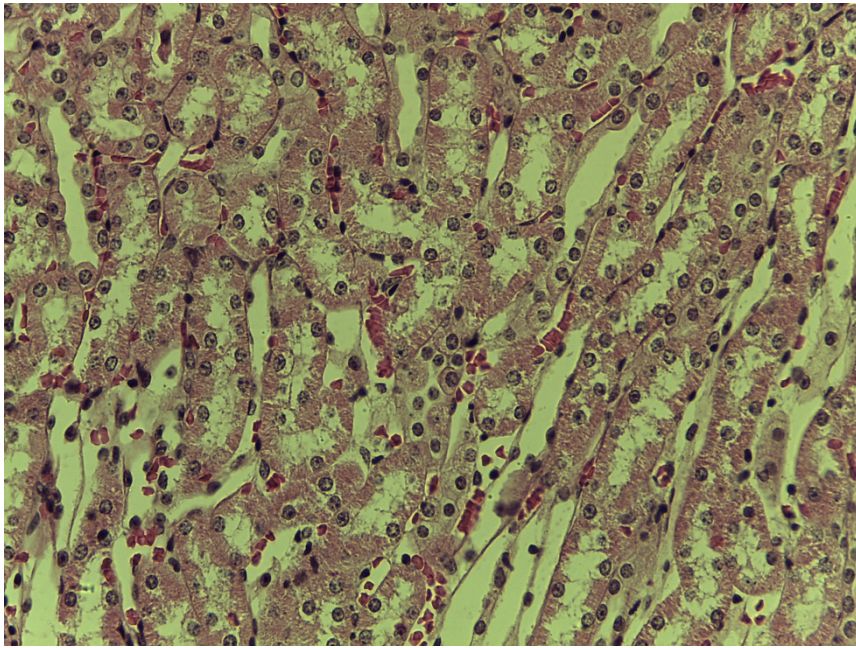


Figura 6: NAC região medular (400x)

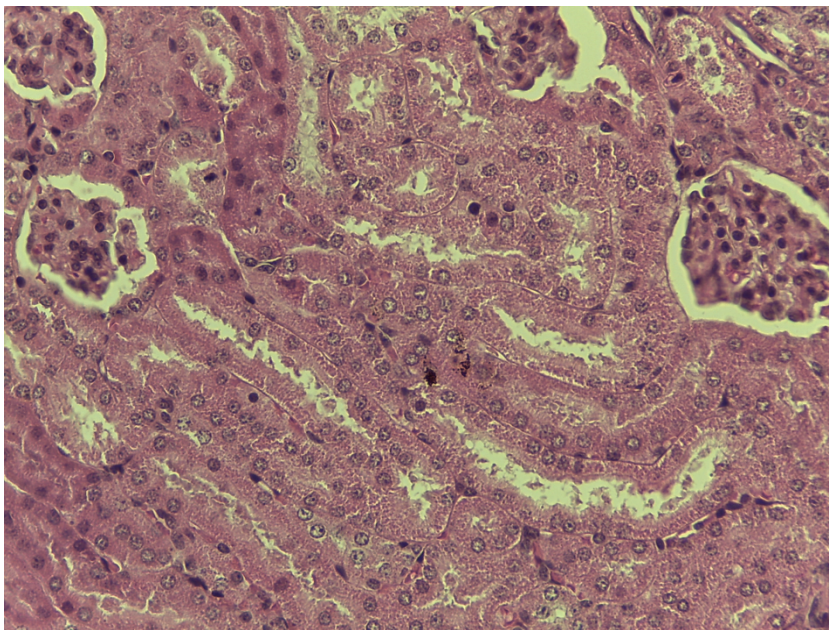


Figura 7: EE100 região cortical (400x)

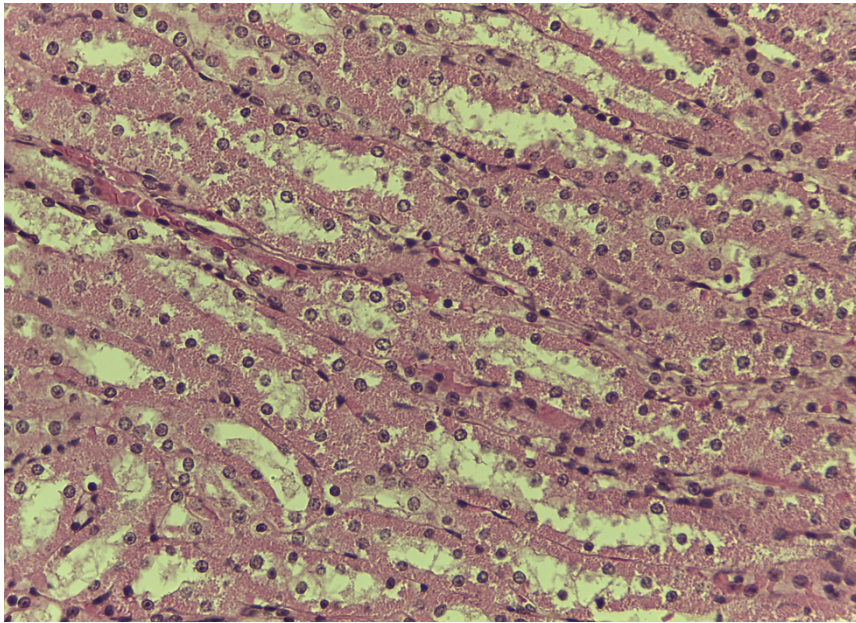


Figura 8: EE100 região medular (400x)

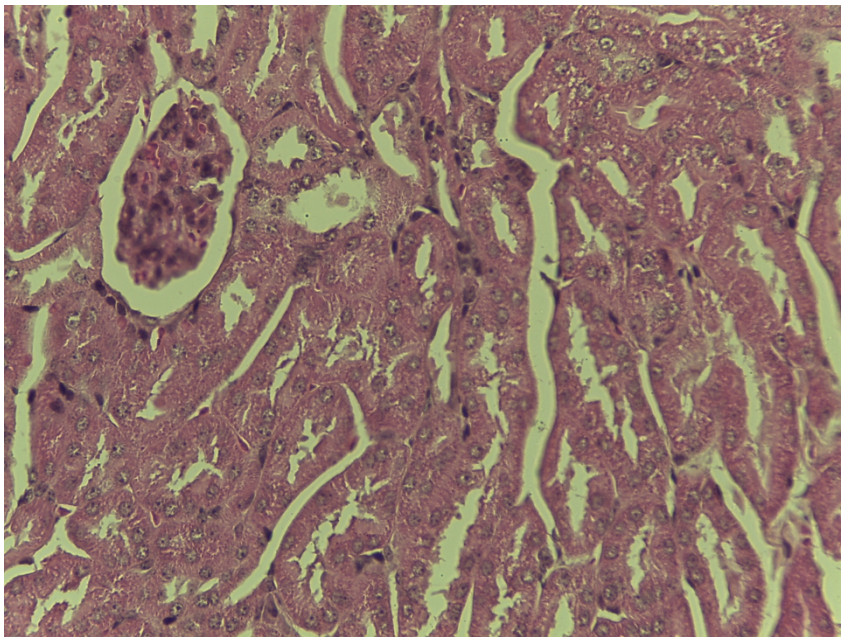


Figura 9: EE200 região cortical (400x)

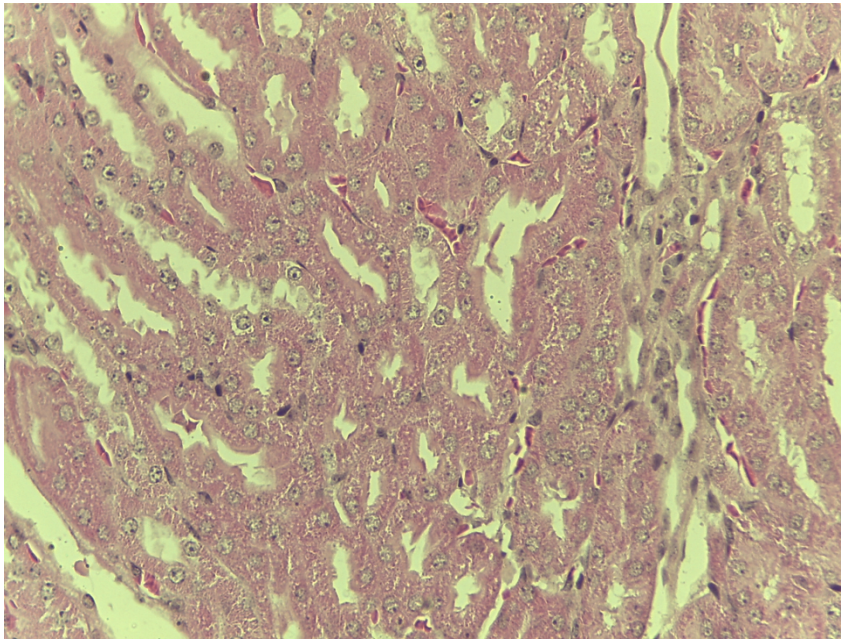


Figura 10: EE200 região medular (400x)

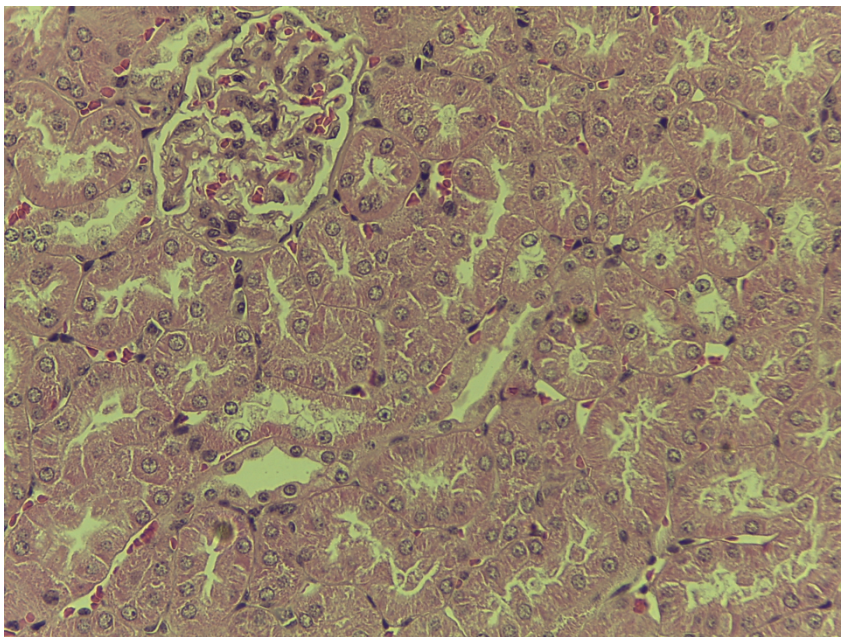


Figura 11: EE400 região cortical (400x)

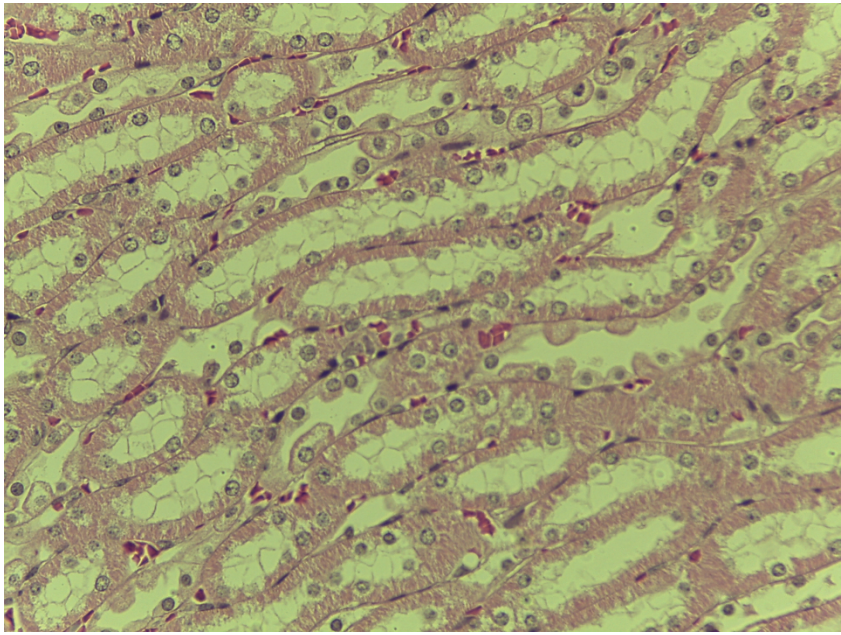


Figura 12: EE400 região medular (400x)

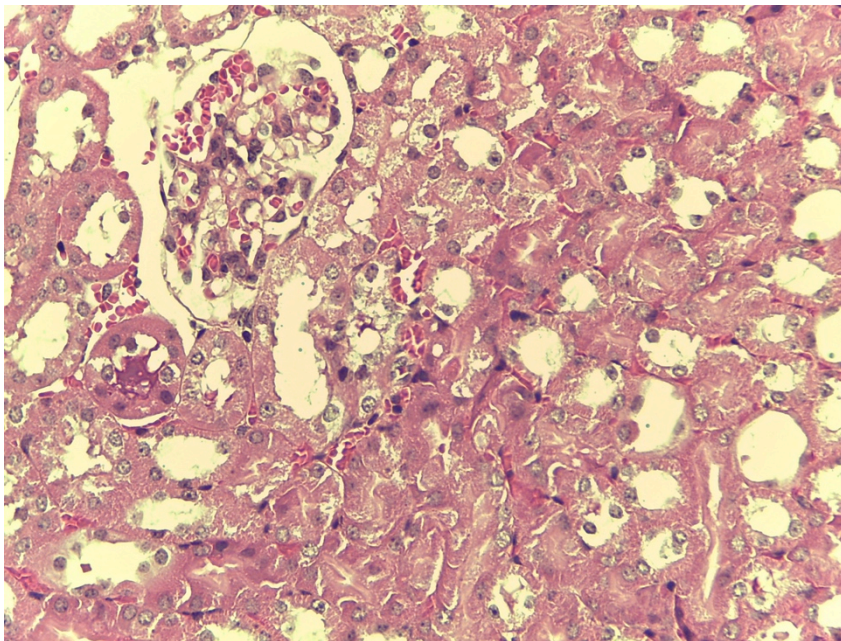


Figura 13: EE400WT região cortical (400x)

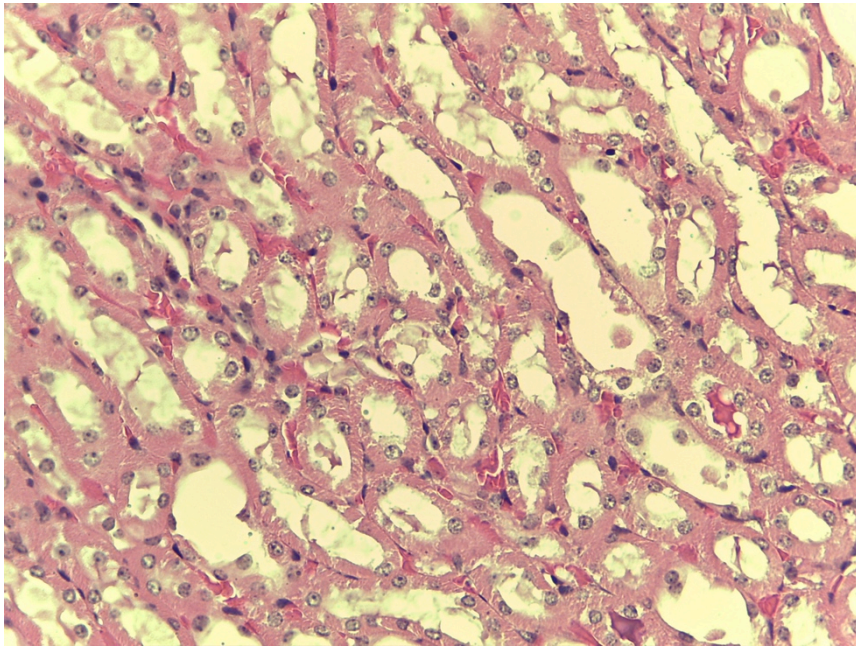


Figura 14: EE400WT região medular (400x)

ANEXO 1



**Comissão de Ética no Uso de
Animais (CEUA- UVV)**

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer Nº. 268/2013- Protocolo de Pesquisa

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Thiago de Melo Costa Pereira

Atividade de extratos vegetais antioxidantes em modelo experimental de nefrologia induzida por contraste.

Situação: **APROVADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA- UVV) analisou na sessão do dia 03 de julho de 2013 o processo nº 268- 2013, referente a pesquisa: "**Atividade de extratos vegetais antioxidantes em modelo experimental de nefrologia induzida por contraste**", tendo como responsável o **Dr. Thiago de Melo Costa Pereira**, sendo considerado adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais das Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Vila Velha.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a esta CEUA, de relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final enviado em PDF.

Vila Velha, 03 de julho de 2013.



Prof. Dr. João Luiz Rossi Junior
Coordenador da CEUA-UVV.

Universidade Vila Velha
Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770
E-mail joao.rossi@uvv.br