

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS ITAQUI  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**EFEITO PROTETOR DO SUCO INTEGRAL  
AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) EM UM MODELO DE  
DANO RENAL INDUZIDO POR CISPLATINA  
EM CAMUNDONGOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Carlos Borges Filho**

**Itaqui, RS, Brasil  
2013**

**CARLOS BORGES FILHO**

**EFEITO PROTETOR DO SUCO INTEGRAL DE  
AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) EM UM MODELO DE  
DANO RENAL INDUZIDO POR CISPLATINA  
EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Itaqui, RS, Brasil  
2013

**CARLOS BORGES FILHO**

**EFEITO PROTETOR DO SUCO INTEGRAL DE  
AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) EM UM MODELO DE  
DANO RENAL INDUZIDO POR CISPLATINA  
EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 11 de maio de 2013.  
Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse  
Orientador  
Curso de Nutrição - Unipampa

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Graciela Salette Centenaro  
Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Unipampa

---

Prof. Msc. Fernanda Aline de Moura  
Curso de Nutrição - Unipampa

Dedico este trabalho a Deus, meu criador, guia, mantenedor, consolador, companheiro, fiel amigo, e pai. Aos meus amados pais, Carlos e Ireni. Aos meus irmãos, Noli, Vera, Dirnamara e Carla, e a toda a minha família, meus exemplos e maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de inspiração, amor e compreensão.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo que me capacitou, guardou e me concedeu chegar até aqui.

Aos meus pais, Carlos e Ireni, que me deram todo apoio e incentivo fundamentais para a conclusão desta jornada.

De uma forma muito especial, à minha irmã Carla, que quando a insegurança fez com que nem eu mesmo acreditasse que chegaria até aqui, me deu o necessário incentivo e aconselhamento que até hoje são guardados.

À minha irmã Dirnamara, constante motivadora durante todo este período.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Flávia Furian, que me inseriu no fascinante ramo da pesquisa, acreditando desde o princípio em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, pela orientação, pelo companheirismo, pelo incentivo, por acreditar em minha capacidade, e pela imensa compreensão e cumplicidade aliados a contínuos ensinamentos de cunho científico e pessoal.

Aos colegas de curso, Natiele da Rosa, Rogério Acosta, Leonardo Falcão, Marcelo Garcia e Estéfani Cruz, pelo imenso companheirismo, amizade, cumplicidade e compartilhamento de conhecimentos que fizeram com que chegássemos até aqui.

Ao colega de curso e laboratório, Lucian Del Fabbro, e aos demais colegas de laboratório, Silvana Peterini Boeira, Marcelo Gomes, André Goes, Leandro Cattelan e Franciele Donato, por todo o companheirismo, compreensão e ensinamentos.

A todos os colegas de curso e professores pelo convívio e pelos momentos de amizade e aprendizado.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

“...Guarda o depósito, evita o palavreado vão e ímpio, e as contradições de uma falsa ciência, pois alguns, professando-a, se desviaram da fé...”.

1ª Timóteo, 6:20

## RESUMO

### **EFEITO PROTETOR DO SUCO INTEGRAL DE AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) EM UM MODELO DE DANO RENAL INDUZIDO POR CISPLATINA EM CAMUNDONGOS**

Autor: Carlos Borges Filho

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Local e data: Itaqui, 13 de maio de 2013.

O consumo crônico do suco integral de amora-preta (SIAP) é relacionado com a prevenção de infecções do trato urinário em humanos. No entanto, os efeitos da ingestão subcrônica de SIAP, sobretudo contra danos não infecciosos, ainda são pouco estudados. Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito da administração subcrônica de SIAP em um modelo de dano renal agudo induzido por cisplatina em camundongos. Um experimento para quantificar as principais antocianinas do SIAP foi realizado, observando-se níveis elevados de cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. Os animais receberam oralmente o SIAP (10ml/kg) durante 7 dias. No sétimo dia, os camundongos também foram administrados intraperitonealmente com cisplatina (10mg/kg). Após 72 horas da administração de cisplatina os camundongos foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a avaliação dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina. Além disso, o rim foi removido e utilizado para análise dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ácido ascórbico (AA) e tióis não protéicos (NPSH). Também foram determinadas as atividades de superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST) e catalase (CAT) no tecido renal. A administração de cisplatina elevou os níveis plasmáticos de uréia e creatinina e inibiu a atividade das enzimas SOD, GST, e CAT no tecido renal. A ingestão de SIAP preveniu o aumento dos níveis de uréia e creatinina e a inibição da CAT. Não foram observados efeitos frente à inibição de SOD e GST induzida pela cisplatina. Em conclusão, o SIAP protegeu o sistema renal dos camundongos contra os efeitos deletérios da cisplatina por meio de mecanismos

antioxidantes. Devido à demonstrada abundância das antocianinas cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, sugere-se que estes compostos estejam individualmente ou sinergicamente envolvidos no papel antioxidante do SIAP. De uma forma mais específica, pode-se inferir que estas antocianinas podem estar relacionadas com a regulação da CAT no tecido renal, já que esta enzima foi o mecanismo aparente do efeito nefroprotetor do SIAP.

Palavras-chave: Antocianinas, estresse oxidativo, catalase, radicais livres, nefroproteção.

## ABSTRACT

### PROTECTIVE EFFECT OF THE WHOLE BLACK MULBERRY (*Rubus sp.*) JUICE IN A MODEL OF RENAL DAMAGE INDUCED BY CISPLATIN IN MICE

Author: Carlos Borges Filho

Advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Data: Itaquí, may 13, 2013.

The chronic consumption of whole black mulberry juice (WBMJ) is related to the prevention of urinary tract diseases in humans. However, the evaluation of the effect of the subchronic intake of WBMJ in the urinary system is poorly studied mainly in non-infectious models. This work aimed to evaluate the effect of the oral administration of WBMJ in a renal damage induced by cisplatin in mice. A preliminary assessment of the levels of anthocyanins in WBMJ was performed, and the prevalence of Cyanidin 3-O-glucoside and Cyanidin 3-O-rutinoside was verified. Mice were orally administered with WBMJ (10ml/kg) for seven days. On the seventh day mice were injected with cisplatin intraperitoneal (10mg/kg). After 72 h, the animals were anesthetized and blood was collected and used for the evaluation of urea and creatinine levels. Kidneys were removed and used for the analysis of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), ascorbic acid (AA), and non-protein thiols (NPSH) levels. Superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) activities were also assessed. The cisplatin administration caused increased urea and creatinine levels, and inhibited SOD, GST and CAT activities. The administration of WBMJ protected against the increase in urea and creatinine levels, and the inhibition of the CAT activity. However, it did not prevent the inhibition of SOD and GST activities induced by cisplatin. In conclusion, WBMJ protected the renal system of mice from the deleterious effects of the administration of cisplatin through antioxidant mechanisms. Due to the abundance of anthocyanins cyanidin 3-O-glucoside and cyanidin 3-O-rutinoside, it is possible that these compounds are involved synergistically or individually in antioxidant role of WBMJ. In a more specific

form, it can be inferred that these anthocyanins could be related to the regulation of CAT in the renal tissue, because this enzyme was apparently the mechanism of nephroprotective effect of WBMJ.

.

Keywords: Anthocyanins, oxidative stress, catalase, free radicals, nephroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma (processado a 450 nm) dos carotenóides de amora-preta.....	20
Figura 2: Cromatograma (processado a 520 nm) das antocianinas de amora-preta .....	21
Figura 3: Dismutação do radical superóxido pela SOD .....	25
Figura 4: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT .....	25
Figura 5: Ação das enzimas GPx e GR.....	26
Figura 6: Estrutura química básica das antocianinas .....	28
Figura 7: Fluxograma de produção de suco integral .....	30
Figura 8: Níveis plasmáticos de uréia e creatinina .....	33
Figura 9: Atividade de SOD no tecido renal .....	35
Figura 10: Atividade de GST no tecido renal.....	36
Figura 11: Atividade de CAT no tecido renal.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de compostos bioativos na amora-preta .....	19
Tabela 2: Características cromatográficas e espectroscópicas de carotenóides de amora-preta .....	20
Tabela 3: Características cromatográficas e espectroscópicas de antocianinas de amora-preta .....	21
Tabela 4: Principais agentes de defesa antioxidante .....	24
Tabela 5: Níveis de AA, NPSH e TBARS no tecido renal.....	34

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	18
3.1 Alimentos funcionais.....	18
3.2 Amora-preta e seus subprodutos .....	18
3.3 Suco integral de amora-preta (SIAP).....	22
3.4 Radicais livres e espécies reativas.....	23
3.5 Defesas antioxidantes .....	24
3.6 Estresse oxidativo .....	26
3.7 Antioxidantes naturais .....	26
3.8 Antocianinas.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Obtenção de suco integral de amora-preta e dose .....	29
4.3 Extração, identificação e quantificação de antocianinas .....	30
4.4 Protocolo experimental.....	30
4.5 Marcadores de dano renal.....	31
4.6 Marcadores de estresse oxidativo.....	31
4.7 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS .....	33
5.1 Perfil de antocianinas do SIAP .....	33
5.2 Marcadores de dano renal.....	33

5.3 Marcadores de estresse oxidativo.....	34
5.3.1 AA, NPSH e TBARS.....	34
5.3.2 SOD.....	34
5.3.3 GST.....	34
5.3.4 CAT.....	35
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÕES.....	41
8 REFERÊNCIAS.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A amora-preta (*Rubus spp.*), que é originária do Irã, é amplamente cultivada no sul da Europa e no sudoeste da Ásia, e é a espécie frutífera mais importante nos países mediterrânicos (Ercisli & Orhan, 2008). No Brasil, a cultura da amora-preta foi introduzida pela Estação Experimental de Pelotas, atual Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul, na década de 70, e desde então seu cultivo vem crescendo nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com a introdução e adaptação de novas cultivares (Antunes, 2002). Entretanto, devido à estrutura frágil e alta atividade respiratória dos frutos, sua vida pós-colheita é relativamente curta, sendo os frutos comercializados preferencialmente na forma industrializada. Os frutos podem ser congelados, enlatados, processados na forma de polpa para utilização em produtos lácteos (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor), sucos e geléias (Antunes, 2002; Antunes et al., 2003).

A amora-preta tem ganhado uma posição importante na indústria de alimentos devido à presença de várias substâncias com propriedades funcionais, sendo conhecida não só por suas qualidades nutricionais e seu sabor, mas também pelo seu uso tradicional na medicina natural (Darias-martin et al., 2003; Fasaeli et al., 2010). A Amora-preta é reconhecida por conter altos níveis de compostos fenólicos ( $\pm 241,7\text{mg}/100\text{g}$ ), principalmente antocianinas ( $\pm 90,5\text{mg}/100\text{g}$ ), além de carotenóides ( $\pm 84,5\mu\text{g}/100\text{g}$ ) e outros compostos bioativos que podem proporcionar inúmeros benefícios à saúde (Ferreira et al., 2010; Cho et al., 2005). Os principais compostos identificados na amora-preta são cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (Suh et al., 2003). As antocianinas são, provavelmente, o maior grupo de compostos fenólicos presentes na dieta humana. Antocianinas de amora-preta têm sido utilizadas para vários fins terapêuticos, incluindo a prevenção de câncer gástrico (Huang et al., 2011), prevenção de câncer de pulmão em células humanas (Chen et al., 2006), prevenção da doença de Alzheimer (Shih et al., 2010), inibição do desenvolvimento de aterosclerose (Harauma et al., 2007), e proteção contra dano hepático (Shih et al., 2010).

Historicamente, o suco integral de amora-preta (SIAP) é consumido para prevenir infecções do trato urinário (ITUs) em humanos. O uso de preparações de amoreira para evitar ITUs tornou-se popular na década de 1920, quando cientistas americanos demonstraram que a urina se tornou mais ácida após a ingestão de

grandes quantidades de amora-preta (Blatherwick e Long, 1923). Estudos subsequentes mostraram que a eficácia da amora não é devido à sua capacidade para acidificar a urina (Liu et al., 2006). Como primeiro passo no desenvolvimento de infecções, as bactérias devem se ligar à célula hospedeira e nos tecidos, as estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) que causam ITUs têm macromoléculas proteínicas (fímbrias) que facilitam a adesão de bactérias às células uroepiteliais no trato urinário. Estudos *In vitro* e *ex vivo* indicam que a amora-preta e seus subprodutos evitam a aderência de bactérias às paredes das células do trato urinário, impedindo assim UTIs (Di Martino et al, 2006; Liu et al., 2006). Dois tipos de compostos da amora-preta foram identificados como tendo atividade anti-adesão: frutose (um açúcar) e proantocianidinas (taninos condensados). A frutose, um constituinte comum de frutas, tem sido relacionada com a redução da aderência de *E. coli* em fímbrias do tipo I em cultura de tecidos (Zafirri et al., 1989). As proantocianidinas de amora-preta têm sido relacionadas com a redução da aderência de *E. coli* com fímbrias do tipo P (Howell et al., 1998).

A cisplatina (cis-diclorodiaminoplatina II) é uma droga antineoplásica sintética usada exclusivamente no tratamento de tumores. A atividade anticancerígena da cisplatina é atribuída à conversão a um complexo, que forma ligações cruzadas com a cadeia dupla de DNA (Baek et al., 2003). O efeito adverso mais comum que limita a eficácia da droga é a nefrotoxicidade que se desenvolve essencialmente no segmento S3 do túbulo proximal. Cerca de 25-35% dos pacientes sofrem uma redução significativa da função renal após uma única dose de cisplatina (Luke et al., 1992). O efeito protetor de diversas substâncias naturais e sintéticas, extratos e alimentos tem sido investigado em modelos de dano renal com cisplatina (Wilhelm et al, 2012;. Ozer et al, 2011;. Nazıroğlu et al, 2004; Rodrigues et al, 2010 ; Yildirim et al, 2003;. e Maliakel et al, 2008), sendo observados efeitos deletérios da cisplatina sobre as defesas antioxidantes e sobre as demais funções fisiológicas dos rins. No entanto, o estudo do efeito do consumo, sobretudo do consumo subcrônico, de amora-preta e seus subprodutos nestes modelos ainda são escassos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do SIAP em um modelo de dano renal agudo induzido por cisplatina em camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Quantificar as concentrações de cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo no SIAP;

2.2.2 Avaliar os níveis séricos de uréia e creatinina;

2.2.3 Quantificar os níveis de ácido ascórbico, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e tióis não protéicos no tecido renal;

2.2.4 Determinar as atividades de glutathione S-transferase, superóxido dismutase e catalase no tecido renal.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Alimentos Funcionais

Entende-se como alimento funcional àquele que beneficia o organismo em uma ou mais funções orgânicas, além da nutrição básica, contribuindo no melhoramento do estado de saúde e bem-estar, podendo simultaneamente reduzir o risco de doenças (Carvalho *et al.*, 2006).

Diversos são os fatores que têm contribuído para o desenvolvimento e estudo aprofundado dos alimentos funcionais, mas, sobretudo destaca-se a conscientização do consumidor, que visa, na contemporaneidade, uma alimentação acrescida de substâncias contribuintes para uma vida mais saudável (Moraes e Colla, 2006).

Conforme Stringheta *et al.* (2007), o Japão na década de 80 foi o pioneiro na formulação do processo de regulamentação específica para os alimentos funcionais, utilizando-se dos alimentos processados, similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal.

No Brasil, a legislação referente aos alimentos funcionais é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que abrange diversas substâncias com alegações funcionais, como antioxidantes naturais, fitoesteróis e fibras dietéticas (ANVISA, 2007).

### 3.2 Amora-preta e seus subprodutos

A amora-preta (*Rubus spp.*) pertence à família Rosaceae, gênero *Rubus*, formando um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 a 500 espécies, conhecidas como *berries*, cujo termo vem sendo usado comumente para descrever qualquer fruta pequena, de sabor adocicado e formato arredondado, incluindo framboesas e amoras-pretas cultivadas na América, Europa, África e Ásia (Lorenzi *et al.*, 2006).

A amoreira-preta é uma planta rústica, de clima temperado, cujo cultivo vem crescendo em diversas regiões do Brasil. Além do Rio Grande do Sul, há plantio de amora-preta no sul de Minas Gerais, na região de Jundiá em São Paulo, Curitiba no Paraná e em Palmas em Santa Catarina (Antunes *et al.*, 2003).

Através de um programa de melhoramento genético para adaptação ao clima e consumo no Brasil, várias cultivares foram desenvolvidas pela Embrapa Clima Temperado, dentre as quais a mais comercializada no Brasil atualmente é a Tupy, e em menor escala, Guarani e Brazos (Ferreira et al., 2010).

Vários compostos lipofílicos e hidrofílicos são encontrados em *berries*, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos altos níveis e ampla diversidade de compostos fenólicos. Porém, acredita-se que o efeito complementar, aditivo e/ou sinérgico resultante dos diversos componentes seja o responsável pelas propriedades biológicas benéficas, ao invés de uma única classe ou composto químico.

Além dos compostos fenólicos totais ( $\pm 241,7\text{mg}/100\text{g}$ ), pode-se destacar as antocianinas ( $\pm 90,5\text{mg}/100\text{g}$ ), os carotenóides ( $\pm 84,5\mu\text{g}/100\text{g}$ ), e os pigmentos naturais presentes nestas frutas. O efeito protetor destes compostos tem sido relacionado ao seu caráter antioxidante, pois os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, possuem a capacidade de doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres (Rice-Evans et al., 1996), já os carotenóides são considerados excelentes desativadores de oxigênio singlet (Di Mascio et al., 1989).

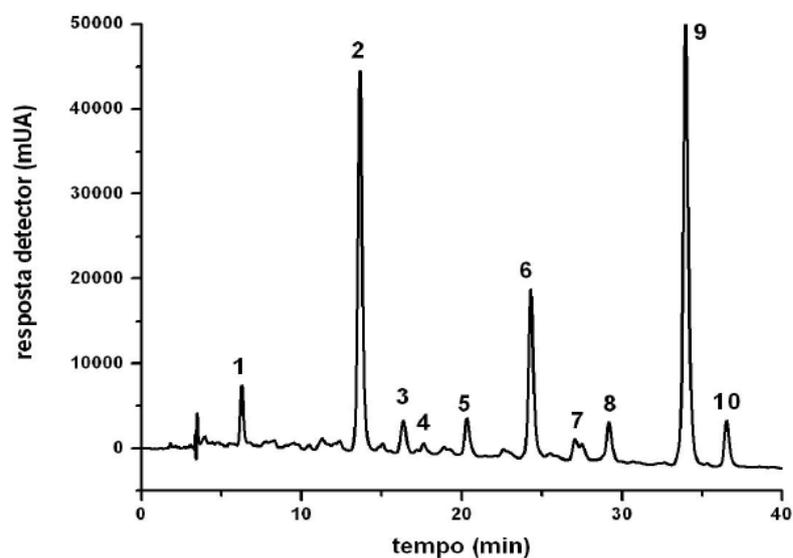
A Tabela 1 apresenta os teores de compostos bioativos de amora-preta, cultivar Tupy.

<b>Compostos bioativos</b>	<b>Concentração</b>
Compostos fenólicos totais	271,7mg/100g
Flavonóides totais	173,7mg/100g
Antocianinas totais	90,5mg/100g
Antocianinas monoméricas	104,1mg/100g
Carotenóides totais	86,5 $\mu\text{g}$ /100g

TABELA 1 - Concentração de compostos bioativos na amora-preta.

Fonte: Ferreira et al. (2010)

As concentrações dos diferentes carotenóides e antocianinas estão representados na Figura 1 e Tabela 2 e Figura 2 e Tabela 3, respectivamente.



Fonte: Ferreira et al. (2010)

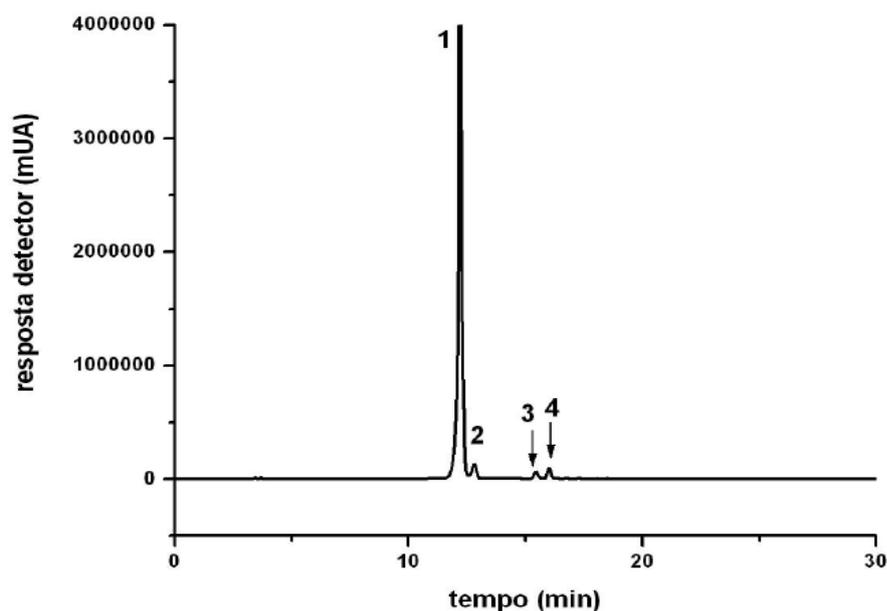
FIGURA 1 - Cromatograma (processado a 450 nm) do extrato de carotenóides de amora-preta. Significação dos números na tabela 2.

TABELA 2 – Características cromatográficas e espectroscópicas de carotenóides de amora-preta.

pico*	carotenóide	$t_R$ (min)
1	não identificado	6,3
2	all- <i>trans</i> -luteína	13,6
3	all- <i>trans</i> -zeaxantina	16,3
4a	5,6-epoxi- $\beta$ -criptoxantina	17,6
4b	fiteno	17,6
5	13- ou 13'- <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	20,3
6	all- <i>trans</i> - $\beta$ -criptoxantina	24,3
7	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	27,1
8	all- <i>trans</i> - $\alpha$ -caroteno	29,2
9	all- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno	34,0
10	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	36,5

Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na figura 1.  $t_R$ : Tempo de retenção.

Fonte: Ferreira et al. (2010).



Fonte: Ferreira et al. (2010)

FIGURA 2 - Cromatograma (processado a 520 nm) do extrato antocianínico de amora-preta. Significação dos números na tabela 3.

TABELA 3 - Características cromatográficas e espectroscópicas de antocianinas de amora-preta.

Pico	tR	Composto
1	12,2	Cianidina 3-glucosídeo
2	12,8	Cianidina 3-rutinosídeo
3	15,4	Cianidina 3-malonil-glucosídeo
4	16,0	Cianidina 3-dioxalil-glucosídeo

Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na figura 2. t<sub>R</sub>: Tempo de retenção

Fonte: Ferreira et al. (2010).

A amoreira-preta possui grande aceitação pelos produtores, devido ao baixo custo de implantação e produção, facilidade de manejo e uso reduzido de defensivos agrícolas. Além do consumo *in natura*, o grande mercado para produtos de amora-preta é gerado a partir do suco clarificado, integral e concentrado, usados como base na elaboração de uma vasta gama de produtos, como caldas para sorvetes, geleias, xaropes, bebidas alcoólicas, refrescos e misturas com sucos de outras frutas (Antunes et al., 2003).

### **3.3 Suco integral de amora-preta (SIAP)**

O suco integral de amora-preta (SIAP) é o suco obtido do processamento do fruto da amoreira-preta de forma integral, sem a remoção de partes do fruto e principalmente sem a diluição em água ou qualquer diluente.

A amora-preta é uma excelente matéria-prima para produção de suco, pois além da qualidade sensorial, contém quantidade elevada de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e com outros benefícios à saúde (Kahlon & Smith, 2007).

Os principais compostos identificados em amoras-pretas são as antocianinas cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (Suh et al., 2003). As antocianinas são, provavelmente, o maior grupo de compostos fenólicos presentes na dieta humana. Antocianinas de amora-preta têm sido utilizadas para vários fins terapêuticos, incluindo a prevenção de câncer gástrico (Huang et al., 2011), prevenção de câncer de pulmão em células humanas (Chen et al., 2006), prevenção da doença de Alzheimer (Shih et al., 2010), inibição do desenvolvimento de aterosclerose (Harauma et al., 2007), e proteção contra dano hepático (Shih et al., 2010).

Historicamente, preparados de amoreira, como o suco integral de amora-preta (SIAP), são consumidos para prevenir infecções do trato urinário (ITUs) em humanos. O uso de preparações de amoreira preta para evitar ITUs tornou-se popular na década de 1920, quando cientistas americanos demonstraram que a urina se tornou mais ácida após a ingestão de grandes quantidades de amoras pretas (Blatherwick e Long, 1923). Estudos subsequentes mostraram que a eficácia da amora não é devido à sua capacidade para acidificar a urina (Liu et al., 2006). Como primeiro passo no desenvolvimento de infecções, as bactérias devem se ligar

à célula hospedeira e nos tecidos. As estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) que causam ITUs têm macromoléculas proteínicas (fímbrias) que facilitam a adesão de bactérias às células uroepiteliais no tracto urinário. Estudos *In vitro* e *ex vivo* indicam que os produtos da amora-preta evitam a aderência de bactérias às paredes das células do trato urinário, impedindo assim ITUs (Di Martino et al, 2006; Liu et al., 2006). Dois tipos de compostos da amora-preta foram identificados como tendo atividade anti-adesão: frutose (um açúcar) e proantocianidinas (taninos condensados). A frutose, um constituinte comum de frutas, tem sido relacionada com a redução da aderência de *E. coli* em fímbrias de tipo I em cultura de tecidos (Zafriiri et al., 1989). As proantocianidinas de amora-preta têm sido relacionadas com a redução da aderência de *E. coli* com fímbrias tipo P (Howell et al., 1998).

### **3.4 Radicais livres e espécies reativas**

Do ponto de vista químico, um radical livre (RL) é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou moléculas capazes de existir sob forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (Southorn & Powis, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999). Portanto, os RLs podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron de uma substância não-radical. Entretanto, existem compostos igualmente reativos aos RLs que não possuem elétron não-pareado na última camada e, por isso não podem ser classificados como radicais livres (Dröge, 2002). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas do oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Os radicais livres e as espécies reativas possuem a característica de reagir com proteínas, lipídios e moléculas de DNA, ocasionando diversos transtornos nos processos fisiológicos.

Uma fonte importante de RLs é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (Del Maestro, 1980), sendo seu principal sítio de formação o complexo citocromo ubiquinona (Tyler, 1975). Na mitocôndria, a enzima citocromo-oxidase promove a redução completa de uma molécula de oxigênio em uma molécula de água e, para isso, são necessários quatro elétrons. Contudo, nem sempre o oxigênio se transforma diretamente em água, em consequência de sua configuração eletrônica. A molécula de oxigênio tem forte tendência, durante as reações, em

receber um elétron de cada vez formando uma série de intermediários tóxicos e reativos (Meneghini, 1987), tais como: radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, e o radical hidroxila. O primeiro e o último destes apresentam elétrons desemparelhados e são classificados como RLs, já o peróxido de hidrogênio não tem elétrons não-pareados na última camada e é classificado como uma ERO.

### 3.5 Defesas antioxidantes

Sob uma definição ampla, um antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (Sies & Stahl, 1995). Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar a atuação acentuada de radicais livres e espécies reativas (Halliwell, 1994). De acordo com Sies (1993), esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (Tabela 4).

TABELA 4 – Principais agentes de defesa antioxidante.

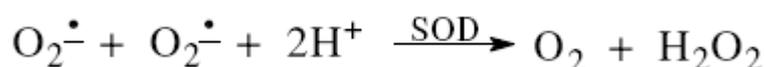
<b>Não-enzimático</b>	L-cisteína
$\alpha$ -tocoferol (vitamina E)	curcumina
$\beta$ -caroteno	<b>Enzimático</b>
Ácido ascórbico (vitamina C)	superóxido dismutase
Flavonóides	catalase
Proteínas do plasma	NADPH-quinona oxidoreductase
Selênio	glutathiona peroxidase
Glutathiona	enzimas de reparo
Clorofilina	

Fonte: Sies (1993).

O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo

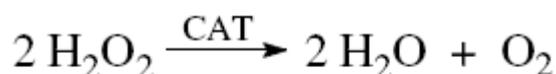
metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.

Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes. O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (Barnett & King, 1995). Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) (Figura 4), a catalase (CAT) (Figura 5), e a glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GRd) (Figura 6) que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (Traber, 1997). Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de RLs (Pompella, 1997).



Fonte: Furian et al. (2010).

FIGURA 3 – Dismutação do radical superóxido pela SOD, com formação de oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio.



Fonte: Furian (2007).

FIGURA 4 – Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT, com formação de água e oxigênio molécula.



Fonte: Furian (2007).

FIGURA 5 – (A) Reação catalisada pela GPx. Decomposição do peróxido de hidrogênio com glutatina reduzida (GSH) como agente redutor. O substrato também pode ser outros peróxidos. (B) Reação de redução da glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona redutase, usando NADPH como coenzima.

### 3.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como o estado de desequilíbrio entre os mecanismos de defesas antioxidantes e a produção de radicais livres. Este estado pode ser decorrente da depleção das defesas antioxidantes ou do aumento na produção de RLs e espécies reativas, ou ainda com ambas as situações ocorrendo concomitantemente (Baynes et al., 1991).

### 3.7 Antioxidantes naturais

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos são encontrados uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (Jacob, 1995; Niki et al., 1995; Hercberg et al., 1998).

Os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento para o consumo (Waters et al., 1996). Por outro lado, os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, também contêm agentes antioxidantes, tais como as antocianinas, as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, os carotenóides, a curcumina e

outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos RLs (Stavric, 1994; Pool-Zobel et al., 1997).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como as antocianinas e os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar os RLs (Decker, 1997). Os compostos fenólicos mais estudados são as antocianinas, o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico. Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir os processos oxidativos desencadeados pelos RLs (Hartman & Shankel, 1990; Halliwell et al., 1995).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes na inativação dos RLs, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (Hartman & Shankel, 1990; Arora *et al.*, 1998).

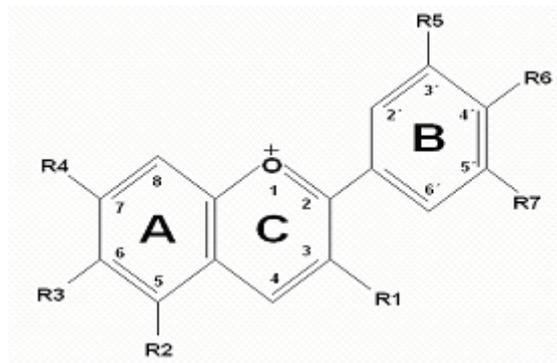
### **3.8 Antocianinas**

O termo antocianina é de origem grega (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro). Após a clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal (Harborne, 1988). As antocianinas compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas (Bridle & Timbarlake, 1997).

As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidante, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes.

A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, mostrada na Figura 6.

Estes agentes naturais, quando adicionados a alimentos, além de conferir a coloração aos alimentos propiciam a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos.



Fonte: López et al. (2000)

FIGURA 6 – Estrutura química básica das antocianinas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 28 camundongos Swiss albinos (3 meses de idade, 25-35g) que foram mantidos sob condições ambientais controladas e adequadas de fotoperíodo, alimentação, água e temperatura. O estudo foi realizado nas instalações do campus de Itaqui (casa de passagem, salas e laboratórios) da Unipampa, e os procedimentos executados na fase clara de fotoperíodo, a fim de evitar alterações circadianas. O uso de animais neste experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Unipampa (processo 028/2012).

### 4.2 Obtenção de suco integral de amora-preta (SIAP) e dose

Amoras-pretas (*Rubus spp.*) foram aleatoriamente colhidas de árvores da região de Itaqui-RS e subsequentemente submetidas a um processo de agitação num misturador durante cerca de dois minutos. O fluxograma geral de procedimentos executados na elaboração do SIAP está representado na Figura 7.

A fim de obter um suco integral, nenhum outro diluente e/ou ingrediente foi adicionado ao suco de amora-preta, visto que de acordo com a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA, 1997), suco de fruta é a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída obtida por meio de processos tecnológicos adequados. A dose selecionada para administração oral de SIAP aos animais é a dose normal utilizada para a administração de qualquer veículo em camundongos (10ml/kg). Esta dose é quantitativamente equivalente a uma dose de 700ml em um adulto de 70 kg. Todos os procedimentos referentes à obtenção do SIAP foram realizados no campus Itaqui da Unipampa.

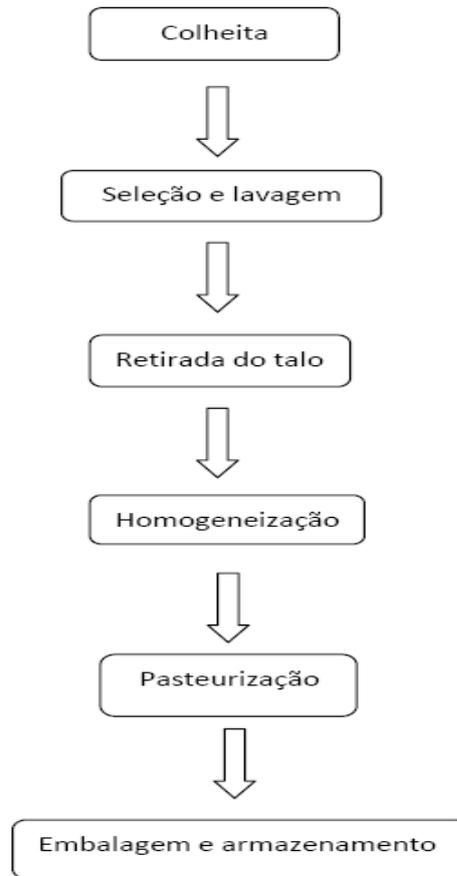


FIGURA 7 - Fluxograma de obtenção de suco integral.

#### 4.3. Extração, identificação e quantificação de antocianinas

Dez gramas de amoras-pretas frescas, cultivar Tupy, foram homogeneizadas em 60ml de solução metanólica de HCl 2%. A solução foi filtrada em funil de Büchner e o filtrado foi utilizado para as análises de HPLC. A extração, identificação e quantificação das antocianinas foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Pawlowska et al. (2008).

#### 4.4 Protocolo experimental:

Os animais receberam doses via oral por gavagem de 10ml/kg de peso corporal de suco de amora-preta (SIAP) ou solução salina 0,9% (m/v) durante 7 dias, uma vez ao dia, pela manhã. No 7º dia, 60 minutos após a administração do SIAP,

os animais receberam uma dose única de cisplatina intraperitoneal (10mg/kg, i.p.) (Ajith et al., 2007; Fouad et al., 2008). Para tal, os animais foram divididos em quatro grupos, contendo sete animais cada. Os quatro grupos receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 (Controle, n:7): Salina + salina;

Grupo 2 (SIAP, n:7): SIAP + salina;

Grupo 3 (Cisplatina, n:7): Salina + cisplatina;

Grupo 4 (SIAP + Cisplatina, n:7): SIAP + cisplatina.

72h após a administração de cisplatina os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca e usado nas dosagens de uréia e creatinina. O rim foi retirado e homogeneizado em tampão Tris/HCl (pH 7,4), centrifugado a 2500rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises de biomarcadores de estresse oxidativo (Wilhelm et al., 2012).

#### **4.5 Marcadores de dano renal**

Os níveis séricos de uréia (Mackay and Mackay, 1927) e creatinina (Jaffe, 1886) foram analisados por meio do uso de Kits (Labtest, Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brasil). Os níveis de uréia e creatinina foram expressos em mg/dl.

#### **4.6 Marcadores de estresse oxidativo**

As determinações de proteínas totais, da atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e dos níveis de ácido ascórbico (AA), tióis não protéicos (NPSH) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram realizadas pelos métodos de Bradford (1976), Misra et al. (1972), Aebi et al. (1995), Habig et al. (1974), Jacques-Silva et al. (2001), Ellman (1959) e Ohkawa et al. (1979), respectivamente.

#### **4.7 Análises estatísticas**

Foi utilizado o software Graphpad prism 5 para a realização das análises estatísticas e elaboração de gráficos. Os dados foram analisados por meio de Two-way ANOVA seguida de teste de médias quando necessário. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Perfil de antocianinas do SIAP

Foram extraídas, identificadas e quantificadas duas antocianinas, cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. Foram observadas concentrações de 190,2mg/100g de fruta para cianidina 3-glucosídeo e 65,6mg/100g de fruta para cianidina 3-rutinosídeo.

### 5.2 Marcadores de dano renal

A ANOVA duas-vias dos níveis de uréia e creatinina relevou uma interação significativa SIAP x Cisplatina ( $F_{1,42} = 8.88$ ;  $p < 0.01$  e  $F_{1,42} = 4.58$ ;  $p < 0.05$ , respectivamente). O teste de Bonferroni mostrou uma elevação significativa nos níveis de uréia ( $F_{1,42} = 8.25$ ;  $p < 0.01$ ) e creatinina ( $F_{1,42} = 6.04$ ;  $p < 0.05$ ) nos animais administrados com cisplatina quando comparados ao grupo controle. A ingestão de SIAP protegeu significativamente frente à elevação nos níveis de uréia ( $F_{1,42} = 10.70$ ;  $p < 0.01$ ) e creatinina ( $F_{1,42} = 5.04$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 8).

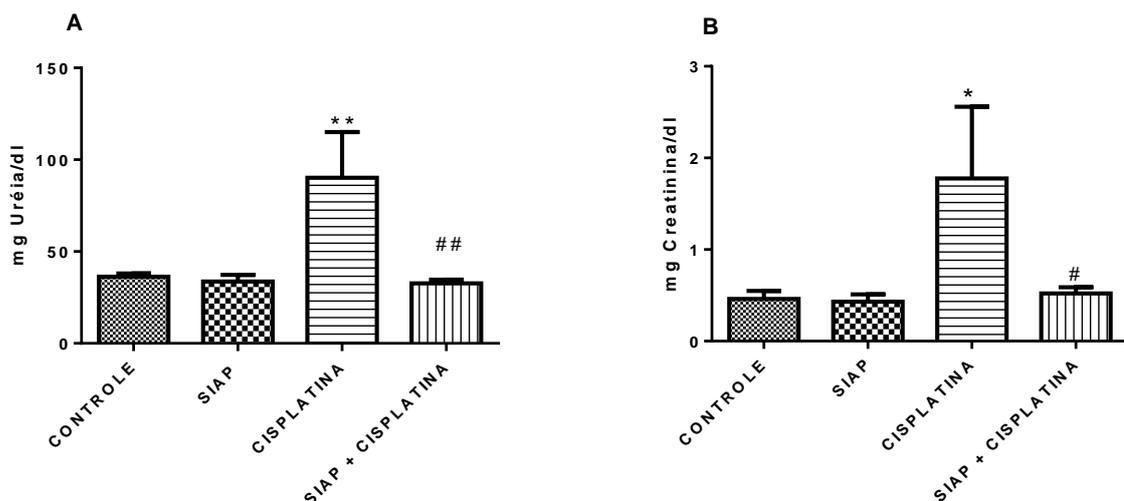


FIGURA 8 – Níveis plasmáticos de uréia (A) e creatinina (B). \* $p < 0,05$  em relação ao controle. \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle. # $p < 0,05$  em relação ao grupo cisplatina. ## $p < 0,01$  em comparação com o grupo cisplatina.

### 5.3 Marcadores de estresse oxidativo

#### 5.3.1 Ácidos ascórbico, NPSH e TBARS

Não foram observadas alterações significativas entre os grupos nos níveis de ácido ascórbico, tióis não protéicos e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido renal (Tabela 5).

TABELA 5 – Níveis de ácido ascórbico, NPSH e TBARS no tecido renal.

Grupos	Ácido ascórbico ( $\mu\text{g}$ ácido ascórbico/g tecido)	NPSH ( $\mu\text{mol}$ GSH/g tecido)	TBARS (nmol MDA /g tecido)
Controle	4,02 $\pm$ 0,79	25,80 $\pm$ 3,95	25,96 $\pm$ 5,41
SIAP	4,64 $\pm$ 0,53	20,29 $\pm$ 6,37	22,55 $\pm$ 6,87
Cisplatina	4,75 $\pm$ 0,84	22,54 $\pm$ 3,40	24,18 $\pm$ 6,08
SIAP + Cisplatina	4,62 $\pm$ 1,12	20,26 $\pm$ 4,78	22,58 $\pm$ 5,65

#### 5.3.2 SOD

A ANOVA duas-vias da atividade da SOD mostrou uma interação significativa SIAP x Cisplatina ( $F_{1,42} = 6.07$ ;  $p < 0,02$ ). O teste de Bonferroni revelou uma inibição da SOD no grupo administrado com cisplatina ( $F_{1,42} = 3.41$ ;  $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo controle. A ingestão de SIAP não protegeu a inibição da SOD (Figura 9).

#### 5.3.3 GST

A ANOVA duas-vias da atividade da GST mostrou uma interação significativa SIAP x Cisplatina ( $F_{1,42} = 2.39$ ;  $p > 0,05$ ). O teste de Bonferroni revelou uma inibição da GST no grupo administrado com cisplatina ( $F_{1,42} = 14.73$ ;  $p < 0.01$ ) quando

comparado ao grupo controle. A ingestão de SIAP não protegeu a inibição da GST (Figura 10).

### 5.3.4 CAT

A ANOVA duas-vias da atividade da CAT mostrou uma interação significativa SIAP x Cisplatina ( $F_{1,42} = 2.85$ ;  $p > 0.05$ ). O teste de Bonferroni revelou uma inibição da CAT no grupo administrado com cisplatina ( $F_{1,42} = 7.70$ ;  $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo controle. A ingestão de SIAP preveniu a inibição da CAT ( $F_{1,42} = 4.50$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 11).

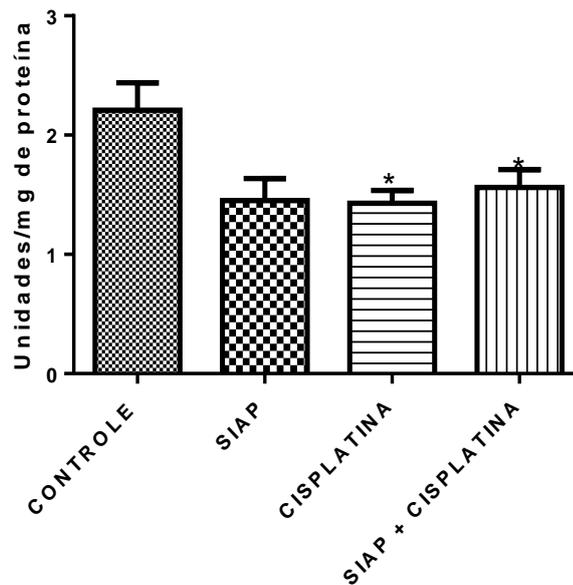


FIGURA 9 – Atividade de SOD no tecido renal. \* $p < 0,05$  em comparação com o controle.

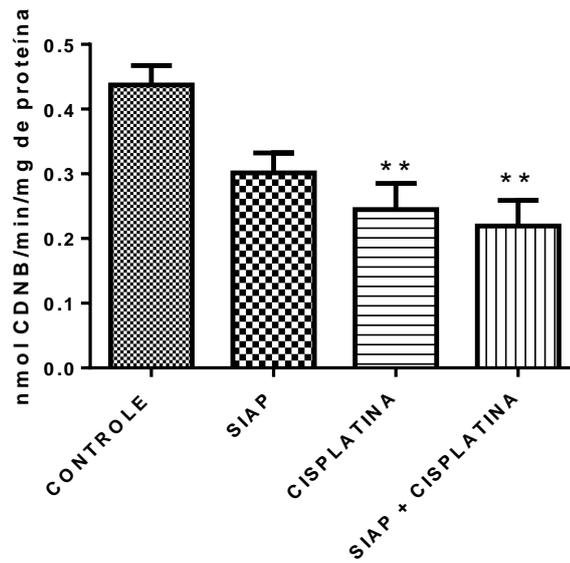


FIGURA 10 - Atividade de GST no tecido renal. \* $p < 0,01$  em comparação com o controle.

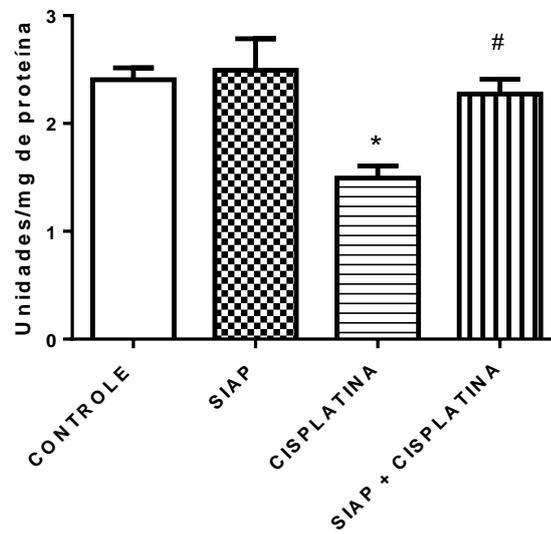


FIGURA 11 - Atividade de CAT no tecido renal. \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle. # $p < 0,05$  em comparação com o grupo cisplatina.

## 6 DISCUSSÃO

O estudo de alimentos funcionais é um ramo que tem ganhado um importante destaque no meio científico, principalmente em virtude das novas exigências de um público consumidor, que busca de uma forma cada vez mais frequente um alimento que além de suas características nutricionais e sensoriais, possa também acrescentar benefícios à saúde (Moraes e Colla, 2006). Um alimento funcional é o alimento que beneficia o corpo em uma ou mais funções biológicas, não só em relação à nutrição básica, mas também na melhoria da saúde e bem-estar, podendo reduzir o risco de doenças (Carvalho et al., 2006). Neste contexto, a amora-preta e seus derivados têm galgado uma posição importante na indústria de alimentos, devido à presença de substâncias com propriedades funcionais (Fasaeli et al., 2011).

Neste estudo, uma análise prévia do perfil das antocianinas do SIAP foi realizada. Foram extraídas, identificadas e quantificadas as duas principais antocianinas da amora-preta em aspectos quantitativos e bioativos, cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, observando-se níveis elevados de ambos os compostos, sobretudo de cianidina 3-O-glicosídeo (190,2mg/100g de fruta). Os resultados obtidos são concordantes com os dados citados por Hager et al. (2008); Wang et al. (2008) e Ferreira et al. (2010), que descreveram a cianidina 3-glucosídeo como sendo a antocianina predominante em amoras-pretas, observando concentrações que variam de 67,4 a 248,0mg/100g de fruta.

A lesão renal induzida pela administração aguda de cisplatina foi evidenciada por um aumento nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina e pela inibição das atividades de SOD, GST e CAT no tecido renal. O efeito protetor do SIAP contra a nefrotoxicidade da cisplatina foi demonstrado pela proteção contra o aumento dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina, e pela prevenção dos da inibição da CAT no tecido renal.

O dano ocasionado pela cisplatina foi evidenciado pelo aumento significativo nos níveis plasmáticos de uréia e de creatinina. Em condições fisiológicas, estas substâncias são continuamente excretadas pelo organismo na urina. Portanto, o aumento de uréia e creatinina no plasma é indicativo de falhas nos processos fisiológicos dos rins. O efeito preventivo do SIAP frente à alteração dos níveis

plasmáticos destas substâncias revela o efeito nefroprotetor do SIAP. Wilhelm et al. (2012) também observaram um aumento significativo nos níveis plasmáticos dessas substâncias ao realizar um tratamento semelhante com cisplatina em camundongos. Outros estudos têm sido realizados avaliando o efeito protetor de várias substâncias, extratos, e alimentos contra danos renais induzidos por cisplatina em roedores, como por exemplo os trabalhos de: Sultana et al. (2012), que mostraram o efeito protetor da administração da crisina, um flavonóide natural, durante 14 dias em ratos. Sharma et al. (2012), que mostraram o efeito nefroprotetor do extrato metanólico de *Eichwaldii heliotropium* em camundongos. Naqshbandi et al. (2012), que relataram o efeito protetor da administração de óleo de peixe durante 10 dias em ratos.

Os níveis de AA, NPSH e TBARS no tecido renal não foram significativamente diferentes entre os grupos. Os níveis de TBARS são um biomarcador de peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo. Iseri et al. (2007) administraram cisplatina em ratos e não observaram alterações significativas nos níveis de TBARS no tecido renal. Por outro lado, Yousef et al. (2009) realizaram um protocolo similar para a indução de estresse oxidativo através da administração de cisplatina em ratos e observaram um aumento significativo nos níveis de TBARS no tecido renal. A manutenção dos níveis de AA no tecido renal mostraram que a alteração dos níveis de AA não foi um dos mecanismos envolvidos na lesão induzida pela administração aguda de cisplatina neste estudo. Estudos em camundongos, ratos e humanos têm mostrado que o AA é essencial para manter níveis adequados de glutathiona, que é a forma estável de cisteína (Paolisso et al, 1995; Meister et al, 1994; Johnston et al, 1993). Assim, devido ao papel antioxidante do AA e a sua relação direta com os níveis de glutathiona, sugere-se que a manutenção dos níveis de AA no tecido renal observada em neste experimento pode estar relacionada com a inalteração dos níveis de TBARS e NPSH no tecido renal. A manutenção dos níveis NPSH mostra que a depleção nos níveis de NPSH não é um dos mecanismos envolvidos na lesão renal induzida pela administração aguda de cisplatina neste estudo. Naghizadeh et al. (2010) e Wilhelm et al. (2012) avaliaram os níveis NPSH no tecido renal de ratos e camundongos, respectivamente, após a administração de cisplatina e observaram uma redução significativa nos níveis de NPSH. Estes resultados são contrários aos obtidos em nosso estudo. A glutathiona reduzida (GSH) é um antioxidante importante e representa cerca de 90% dos níveis de NPSH. Ela

desempenha um papel vital na desintoxicação de uma variedade de compostos eletrófilos e peróxidos via catálise por glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx). Assim, dado o importante papel dos grupos tióis nas defesas antioxidantes, a manutenção dos níveis adequados de NPSH pode estar envolvida com a manutenção de níveis normais de TBARS observados neste trabalho. Além disso, fatores como espécie, linhagem, sexo, dose e tempo entre a administração de cisplatina e a eutanásia, podem estar relacionados com as diferenças dos resultados dos níveis de TBARS, AA e NPSH entre os referidos estudos e este experimento.

A administração de cisplatina inibiu significativamente a atividade da SOD no tecido renal. A SOD é uma enzima essencial para todas as células aeróbias por catalisar a dismutação do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Chance et al, 1979;. Southorn & Powis, 1988). Assim, considerando a importância da SOD para os processos fisiológicos dos rins, a inibição da atividade da SOD observada neste estudo é provavelmente um dos mecanismos envolvidos na lesão renal induzida pela administração aguda de cisplatina em camundongos. A administração de SIAP não protegeu contra a inibição da atividade da SOD no tecido renal, o que mostra que esta enzima não está relacionada com o efeito nefroprotetor do SIAP.

A atividade de GST foi significativamente inibida no grupo administrado com cisplatina. Sahu et al. (2011) e Wilhelm et al. (2012) avaliaram a atividade de GST no tecido renal de ratos e camundongos, respectivamente, após a administração de cisplatina, e também verificaram uma redução significativa na atividade de GST. A GST é um importante grupo de proteínas envolvidas na desintoxicação de compostos eletrofílicos gerados intracelularmente ou na forma de xenobióticos (Torres et al., 2006). Assim, devido à importância desta enzima para a fisiologia renal, a redução da atividade de GST decorrente da administração de cisplatina mostra que a inibição de GST é provavelmente um dos mecanismos envolvidos no efeito nefrotóxico da cisplatina. A administração de SIAP não protegeu significativamente contra a inibição da atividade de GST induzida pela cisplatina. Isto mostra que esta enzima não está envolvida no efeito nefroprotetor do SIAP.

A atividade de CAT foi significativamente inibida no grupo administrado com cisplatina. A ingestão de SIAP protegeu significativamente contra a inibição da atividade de CAT. Com isso, verifica-se que a inibição da atividade de CAT no tecido renal observada neste estudo é um dos mecanismos envolvidos no efeito nefrotóxico

da cisplatina, corroborando com os achados de Ozer et al. (2011) e Wilhelm et al. (2012). Neste contexto, a proteção da inibição da atividade de CAT é um fator crucial para a proteção contra os danos renais resultantes de estresse oxidativo provocado pela administração de cisplatina. O fato de o SIAP prevenir a inibição da CAT no tecido renal mostra que este efeito é um dos mecanismos ou o único mecanismo envolvido no efeito protetor do SIAP neste modelo de lesão renal. Confirmando a importância da regulação da CAT como um mecanismo de proteção em modelos de dano renal, Ibrahim et al. (2010) mostraram o papel da CAT em um modelo de lesão renal induzida por glicerol em ratos. Além disso, Ozer et al. (2011) e Wilhelm et al. (2012) demonstraram o papel da CAT em um modelo de lesão renal induzida por cisplatina em ratos e camundongos, respectivamente.

A bioatividade da amora-preta é atribuída à sua elevada concentração de antocianinas (Ferreira et al. 2010). De acordo com Rice-Evans et al. (1996), as antocianinas atuam como antioxidantes doando hidrogênios para radicais livres. Como relatado anteriormente, foram verificadas elevadas concentrações das antocianinas cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo no SIAP, corroborando com os achados de Ferreira et al. (2010) e Suh et al. (2003). Vários autores, como Du et al. (2008), Chang et al. (2011), e Shih et al. (2010), relataram as propriedades antioxidantes de antocianinas de amoras-pretas. Portanto, devido às elevadas concentrações e à constatada bioatividade das antocianinas da amora-preta, é provável que cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo estejam, individualmente ou sinergicamente, envolvidas no efeito nefroprotetor do SIAP, bem como estejam relacionadas com a regulação da CAT no tecido renal.

## 7 CONCLUSÕES

- Observaram-se elevadas concentrações das antocianinas cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo no SIAP, sobretudo da antocianina cianidina 3-glucosídeo;
- O efeito protetor do SIAP foi revelado pela proteção contra a alteração nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina, e pela prevenção da inibição da CAT no tecido renal;
- O principal mecanismo que parece estar envolvido no efeito nefroprotetor do SIAP é a regulação da CAT no tecido renal, no entanto, mais estudos são necessários para a obtenção de respostas mais conclusivas;
- Devido às altas concentrações e à comprovada bioatividade de cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, sugere-se que estes compostos estejam individualmente ou sinergicamente envolvidos no efeito protetor do SIAP, bem como estejam relacionados com a regulação da CAT no tecido renal;
- Os resultados apresentados neste trabalho reforçam a importância da realização de novos estudos acerca do assunto e da inclusão constante e crescente da amora-preta e seus subprodutos na dieta humana.

## 8 REFERÊNCIAS

Aebi, U., Chiu, W., & Milligan, R. Role of catalase on antioxidative defenses. **J.StructBiol**, v. 1;2, p.117–8, 1984.

Ajith, T.A., Usha, S., & Nivitha, V. Ascorbic acid and alpha-tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice. a comparative study. **Clin. Chim. Acta**, v. 375, p. 82–86, 2007.

Antunes, L.E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 151-158, 2002.

Antunes, L. E. C., Duarte Filho, J., & Souza, C. M. Postharvest fruit of blackberry. **Brazilian Agricultural Research Corporation**, v. 38, p. 413-419, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2007. Disponível em [www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acessado em 22 de maio de 2010.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Decreto nº 2314, de 4 de setembro de 1997.

Arora, A., Muraleedhran, G.N., & Stranburg, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, p.1355-1363, 1998.

Baek, S.M., Kwon, C.H., Kim, J.H., Woo, J.S., Jung, J.S., & Kim, Y.K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 142, p. 178–186, 2003.

Barnett, Y.A., & King, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Research**, v.338, p.115-128, 1995.

Baynes, J. W, Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v.40, p. 405-412, 1991.

Blatherwick, N.R., & Long, M.L. Studies of urinary acidity, II: the increased acidity produced by eating prunes and cranberries. **J. Biol. Chem.**, 57, 815–818, 1923.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

Bridle, P., & Timberlake, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, p.103-109, 1997.

Carvalho, P. G. B. de, Machado, C. M. M., Moretti, C. L., & Fonseca, M. E. de N. Vegetables as functional foods. **Hortic. Bras.**, v. 24, p. 397-404, 2006.

Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527 – 605, 1979.

Chang, L., Juang, L., Wang B., Wang M., Tai, H., Hung, W., Chen, Y., & Huang, M. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 785-790, 2011.

Chen, P., Chu, S., Chiou, H., Kuo, W., Chiang, C., & Hsieh, Y. Mulberryanthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, p. 248-259, 2006.

Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., & Clark, J.R. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Sci. Food Agric.**, v. 85, p. 2149–2158, 2005.

Darias-Martín, J., Lobo-Rodrigo, G., Hernández-Cordero, J., Díaz-Día, E., & Díaz-Romero, C. Alcoholic beverages obtained from blackmulberry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 173–176, 2003.

Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

Del Maestro, R.F. An approach and to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v. 492, p.153-167, 1980.

Di Martino, P., Agniel, R., David, K., Templer, C., Gaillard, J.L., Denys, P., & Botto, H. Reduction of Escherichia coli adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. **World J. Urol.**, v. 24, p. 21–27, 2006.

Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.274, p.532-538, 1989.

Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cells function. **Physiological Reviews**, v. 82, p.47-95, 2002.

Du, Q., Zheng, J., & Xu, Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 390–395, 2008.

Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem.**, v. 82, p. 70-77, 1959.

Ercisli, S., & Orhan, E. Some physico-chemical characteristics of blackmulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 116, p. 41–46, 2008.

Fasaeli, M., Yousefi, S., & Emam-Djomeh, Z. Investigation on the effects of microwave and conventional heating methods on the phytochemicals of

pomegranate (*Punica granatum* L.) and blackmulberryjuices. **Food Research International**. In press, 2011.

Ferreira, D.S., Rosso, V. V. de., & Mercadante, A.Z. Bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* spp.) grown in Brazil. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 32, p. 664-674, 2010.

Fouad, A.A., Morsy, M.A., & Gomaa, W. Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 25, 292–297, 2008.

Furian, A. F. **Efeito do gangliosídeo GM1 sobre a atividade da catalase em estriado, hipocampo e Cortez cerebral de ratos**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica (Nível Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007

Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleishner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., & Jacoby, W. B. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 71, p. 3879–3882, 1974.

Hager, T., Howard, L.R., & Prior, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.689-695, 2008.

Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Lolinger, L., & Aruoma, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.601-617, 1995.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. C. **Free radicals in biology and medicine**, 3<sup>a</sup> ed., New York, Oxford University Press, 1999.

Harauma, A., Murayama, T., Ikeyama, K., Sano, H., Arai, H., Takano, R., Kita, T., Hara, S., Kamei, K., & Yokode, M. Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 751–756, 2007.

Harborne, J.B., **The flavonoids: recent advances**, in: Plant Pigments, Academic Press, London, p.298–343, 1988.

Hartman, P.E., & Shankel, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.15, p.145-182, 1990.

Hecberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Roussel, A.M., Arnaud, J., Richard, M.J., Malvy, D., Pauldauphin, A., Briancon, S., & Favier, A. Background and rationale behind the SU.VI. MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. **International Journal for Vitamins and Nutrition Research**, v.68, p.3- 20, 1998.

Howell, A.B., Vorsa, N., Der Marderosian, A., & Foo, L.Y., Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. **New Engl. J. Med.** v. 339, p. 1085–1086, 1998.

Huang, H., Chang, Y., Wu, C., Hing, C., & Wang, C. Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. **Food Chemistry**, 129, 1703-1709, 2011.

Ibrahim, M., Luchese, C., Pinton, S., Roman, S. S., Hassan, W., Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. T. Involvement of catalase in the protective effect of binaphthyl diselenide against renal damage induced by glycerol. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 331-335, 2010.

Işeri, S., Ercan, F., Gedik, N., Yüksel, M., & Alican, I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. **Toxicology**, v. 230, p. 256-264, 2007.

Jacob, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v.15, p.755-766, 1995.

Jacques-Silva, M. C., Nogueira, C. W., Broch, L. C., Flores, E. M. M., & Rocha, J. B. T. Diphenyldiselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **PharmToxicol.**, v. 88, p. 119–25, 2001.

Jaffe, M.Z. Methods determining creatinine. **Physiol. Chem.**, v. 10, p. 39–40, 1986.

Johnston, C. S., Meyer, C. G., & Srilakshmi, J. C. Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. **Am J Clin Nutr**, v. 58, p. 103–5, 1993.

Kahlon, T. S., & Smith, G. E. In vitro binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp.), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria ananassa*), cherries (*Malpighia punicifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1182–1187, 2007.

Liu, Y., Black, M.A., Caron, L., & Camesano, T.A. Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 93, p. 297–305, 2006.

López, O.P., Jiménez, A.R., & Vargas, F.D. et al. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v.40, p.173-289, 2000.

Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M., & Sartori, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa: Instituto Plantarum,. p.627, 2006.

Luke, D.R., Vadiiei, K., & Lopez-Berestein, G. Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 7, p. 1–7, 1992.

Mackay, E.M., & Mackay, L.L. Methods determining urea. **J. Clin. Invest.**, v. 4, p. 295–296, 1927.

Maliakel, D.M., Kagiya, T.V., & Nair, C.K.K. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, p. 521–527, 2008.

Meister, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J Biol Chem**, v. 269, p. 9397–400, 1994.

Meneghini, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 57-62, 1987.

Misra, H. P., & Fridovich, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 6960–6962, 1972.

Moraes, F. P., & Colla, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definitions, legislation and health benefits. **Electronic Journal of pharmacy**, v. 3, p. 109 – 122, 2006.

Naghizadeh, B., Mohammad, S., Mansouri, T., & Mashhadian, N. V. Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2650–2655, 2010.

Naqshbandi, A., Khan M. W., Rizwan, S., Rehman, S.U., & Khan, F. Studies on the protective effect of dietary fish oil on cisplatin induced nephrotoxicity in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 50, p. 265-73, 2012.

Nazırođlu, M., Karaođlu., A., & Aksoy, A. O. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. **Toxicology**, 195, 221–230, 2004.

Niki, E., Nogushi, N., Tsuchihashi, H., & Gotoh, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and b-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1322-1326, 1995.

Ohkawa, H., Ohish, N., & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351–8, 1979.

Ozer, M.K., Asci, H., Oncu, M., Calapoglu, M., Savran, M., Yesilot, S., Candan, I. A., & Cicek, E. Effects of misoprostol on cisplatin-induced renal damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1556–1559, 2011.

Paolisso, G., Balbi, V., Volpe, C., Varricchio, G., Gambardella, A., Saccomanno, F., Ammendola, S., Varricchio, M., & D'Onofrio, F. Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. **J Am Coll Nutr**, v. 14, p. 387–92, 1995.

Pawlowska, A. M., Oleszek, W., & Braca, A. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra L.* and *Morus alba L.* (Moraceae) Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 3377–3380, 2008.

Pompella, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.67, p.289-297, 1997.

Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Muller, H., Wollowski, I., & Rechkemmer, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, v.18, p.1847-1850, 1997.

Rive-Evans, C.A., Miller, N.J., & Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

Rodrigues, M.A.C., Rodrigues' J.L., Martins, N.M., Barbosa, F., Curti, C., Santos, N.A.G., & Santos, A.C. Carvedilol protects against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats. **Mitochondrion**, v. 10, p. 46–53, 2010.

Sahu, B. D., Rentam, K. K. ., Putcha, U. K., Kuncha, M., Vegi, G. M. N., & Sistla, R. Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3090-3097, 2011.

Sharma, S.K., & Goyal, N. Protective effect of *Heliotropium eichwaldi* against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.**, v. 10, p. 555-60, 2012.

Shih, P., Chan, Y., Liao, J., Wang, M., & Yen, G. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 598–605, 2010.

Sies, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, p.213- 219, 1993.

Sies, H., & Stahl, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1315-1321, 1995.

Southorn, P. A. & Powis, G. Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 381-389, 1988.

Stavric, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chemical Toxicology**, v.32, p.79-90, 1994.

Stringheta, P. C., Oliveira, T. T. de., Gomes, R. C., Amaral, M. da P. H. do., Carvalho, A. F. de., & Vilela, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n.2, 2007.

Suh, H. J., Noh, D. O., Kang, C. S., Kim, J. M., & Lee, S. M. Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract. **Nahrung/Food**, v. 47, p. 132–135, 2003.

Sultana, S., Verma, K., & Khan, R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. **J Pharm Pharmacol.**, 64, 872-81, 2012.

Torres, M. C. L., Soares, N. de F. F., & Pereira, J. A. M. Extraction of glutathione s-transferase from bovine liver. **Ciênc. agrotec.**, v. 30, p. 302-307, 2006.

Traber, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v.23, p.135-139, 1997.

Tyler, D. D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. **Journal of Biochemistry**, v. 147, p. 493-504, 1975.

Wang, S.Y., Bowman, L.; & Ding, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, v.107, p.1261-1269, 2008.

Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A., Brockman, H.E., & De Flora, S. Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. **Mutation Research**, v.350, p.109-129, 1996.

Wilhelm, E.A., Bortolatto, C.F., & Nogueira, C.W. p-Methoxyl-diphenyl diselenide protects against cisplatin-induced renal toxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1187–1193, 2012.

Yildirim, Z., Sogut, S., Odaci, E., Iraz, M., Ozyurt, H., Kotuk, M., & Akyol, O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 149–156, 2003.

Yousef, M. I., Saad, A. A., El-Shennawy, L. K. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1176–1183, 2009.

Zafiri, D., Ofek, I., Adar, R., Pocino, M., & Sharon, N., Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P-fimbriated Escherichia coli to eukaryotic cells. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 33, p. 92–98. 1989.