



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIANA MACIEL CAVALCANTI

EFEITO NEFROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA*
(MILL.) N.E. BROWN (ERVA-CIDREIRA) QUIMIOTIPO II EM MODELOS
DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

FORTALEZA

2018

MARIANA MACIEL CAVALCANTI

**EFEITO NEFROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA*
(MILL.) N.E. BROWN (ERVA-CIDREIRA) QUIMIOTIPO II EM MODELOS
DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada a coordenação do Programa de pós graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador (a): Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C366e Cavalcanti, Mariana Maciel.
EFEITO NEFROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA ALBA (MILL.) N.E. BROWN
(ERVA-CIDREIRA) QUIMIOTIPO II EM MODELOS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO / Mariana
Maciel Cavalcanti. – 2018.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.

1. Lesão Renal Aguda. 2. Isquemia. 3. Reperfusão. 4. Lippia. I. Título.

CDD 615.1

MARIANA MACIEL CAVALCANTI

**EFEITO NEFROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA*
(MILL.) N.E. BROWN (ERVA-CIDREIRA) QUIMIOTIPO II EM MODELOS
DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada a coordenação do Programa de pós graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Orientador (a): Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira (UFC)

Profa. Dr. Daniel Freire de Sousa (UNILAB)

Profa. Dra Alice Maria Costa Martins (UFC)

À Júlia, o amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos em que quase perdi a fé ou quis desistir. Foi ele quem me levantou.

A professora Alice Martins, agradeço pela confiança, pelos ensinamentos e por todas as conversas compartilhadas durante os anos de mestrado.

A professora Mary Anne Bandeira, pela confiança e parceria, que tornaram esse estudo uma realidade.

A Júlia, o maior presente que poderia ter ganhado. Veio prontinha para mim, afinal, somos tão parecidas em tudo. Apesar de tão pequena, demonstra ser uma criança forte e decidida de suas vontades. Minha jujuba, você me faz mais forte em todos os momentos e nunca deixaremos de ser parceiras.

A minha mãe Adriana, agradeço por todo o apoio e dedicação a mim durante a vida e, principalmente, pelo amor dado a Júlia, nosso maior tesouro.

A meu pai Caruso, obrigada por torcer tanto pelo meu sucesso e por minha felicidade. Com certeza, meu amor por você não dá para mensurar.

A meu irmão Lucas, pela convivência que tivemos durante o mestrado, pelas conversas e pela suas orações e torcida. Me espelho em você, como ser humano.

A minha família, principalmente, minhas tias, que considero como mães. Obrigada por todos os ensinamentos e puxões de orelha. Agradeço, também, em especial, a minha prima Thaís Maciel, só nós duas sabemos, como você me ajudou no momento mais complicado da minha vida.

Aos Power Rangers, Marília, Lucas, Robério, Ana Márcia, Raul e Iolanda, não consigo imaginar como passamos tantos dias longe uns dos outros. Somos família, somos irmãos. Sei que com vocês jamais estarei sozinha.

A Marília Lopes, minha prima, minha irmã, companheira de profissão, de pesquisa e de laboratório. Obrigada, prima, por todos os dias que segurou minha mão e disse que daria certo, por todos os experimentos, finais de semana e madrugadas em que estivemos juntas nos apoiando.

Ao trio maravilha, Renata Iepsen e Camila Zappe, os presentes que ganhei durante o ano de 2017 e que, com certeza vou carregar pelo resto da vida. Renata, com seu jeito único de ser, totalmente racional e, ao mesmo tempo, extremamente carinhosa. Seus abraços e palavras valem mais que qualquer ouro do mundo. Camila, companheira da vida acadêmica, obrigada por segurar minha mão, mesmo distante, queria que Santa Maria fosse ali no outro lado da rua. Somos tão parecidas em tudo, obrigada por todos os momentos lindos que compartilhamos. Amo vocês demais.

As amizades que cultivei durante esses dois anos, Mayara, Nathália, Bia Maia, Jade, Bárbara Brayner (parceira de desespero da pós graduação), Erlânia, Letícia Braga e a outros amigos queridos. Obrigada por tornarem a vida mais leve.

A Solange, obrigada por tudo. Por não me deixar fraquejar, por me ouvir, por saber o que dizer nos melhores e piores momentos. Sem você, com certeza não seria a pessoa que hoje sou.

Aos parceiros de laboratório, Gdayllon, Gabriela, Ramon, Livia, Emanuel, Márcia, obrigada por todo o apoio, por toda ajuda.

A Isabella e Dânya, pessoas incríveis, que Deus colocou em meu caminho. Bella, minha parceira da vida, com as palavras certas na hora certa. Dânya, meu modelo de pesquisadora, conte comigo para tudo.

Aos meus amigos, Tiago e Marcus Felipe, que dedicaram seu tempo e esforço para a realização dos experimentos. Obrigada por me ajudarem tanto!

Ao CEFAC – UFC, sou grata pela ajuda em alguns experimentos.

A banca, pelas considerações e disponibilidade em participar desse momento tão importante.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

“É preciso gostar do erro, topar se arrepender, ter orgulho na caminhada por si só. Não dá para ter tristeza muito longa, nem alegria de mentira. Há tempo e há vida...”

Mallu Magalhães

RESUMO

EFEITO NEFROPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N.E. BROWN (ERVA-CIDREIRA) QUIMIOTIPO II EM MODELOS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A Isquemia e Reperfusão (I/R) é um dos principais fatores desencadeantes da Lesão Renal Aguda (LRA), tal processo leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam estresse oxidativo celular. Substâncias naturais antioxidantes são amplamente pesquisadas para tratar esse tipo de injúria por I/R, dentre elas os óleos essenciais, como o da *Lippia alba* (erva-cidreira), que produz óleo essencial rico em substâncias antioxidantes, como citral e limoneno. Assim, esse estudo tem como objetivo analisar o possível efeito nefroprotetor do óleo essencial de *Lippia alba* na LRA em modelos de Isquemia/Reperfusão (I/R). Para isso, ratos Wistar machos (~200-250g) foram submetidos à nefrectomia direita e clampeamento da artéria renal esquerda, sendo estabelecida a injúria renal. A seguir, foi realizada a cirurgia em animais, que receberam o óleo essencial de *Lippia alba* (200mg/kg- intraperitoneal). Foram coletadas amostras de sangue, urina e tecido renal para avaliações bioquímicas (creatinina, ureia, ácido úrico, clearance de creatinina, proteinúria e microalbuminúria) e análises antioxidantes (MDA e GSH). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (nº 110/2017). Além disso, realizou-se um modelo *in vitro* de I/R, utilizando linhagens de células tubulares renais LLC-MK2 e HK-2 para análise de viabilidade celular por redução do MTT, bem como avaliação das alterações ultraestruturais das células por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. O óleo essencial de *Lippia alba* apresentou a capacidade de proteção renal no experimento *in vivo*, reduzindo os valores de creatinina, ureia, ácido úrico e aumentando o clearance de creatinina nos grupos tratados, bem como reduzindo o estresse oxidativo. No ensaio *in vitro*, o óleo foi capaz de reverter a lesão por I/R. Com isso, foi observado que o óleo essencial de *Lippia alba* se apresentou como uma substância promissora na prevenção ou redução da lesão renal aguda, visto que, através de possíveis mecanismos antioxidantes levou a nefroproteção nos modelos de I/R.

PALAVRAS-CHAVES: Lesão Renal Aguda; Isquemia; Reperfusão; *Lippia*

ABSTRACT

NEPHROPROTECTIVE EFFECT OF ESSENTIAL OIL OF *LIPPZIA ALBA* (MILL.) N.E. BROWN (LEMONGRASS) CHEMICAL II IN ISCHEMIA AND REPERFUSION MODELS

Ischemia and Reperfusion (I/R) is one of the main triggering factors for acute renal injury (AKI). This process leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) that cause cellular oxidative stress. Natural antioxidant substances are widely researched to treat this type of I/R injury, including essential oils such as *Lippzia alba* (lemon balm), which produces essential oil rich in antioxidants such as citral and limonene. Thus, this study aims to analyze the possible nephroprotective effect of *Lippzia alba* essential oil on AKI in Ischemia and Reperfusion (I/R) models. For this, male Wistar rats (~ 200-250g) were submitted to right nephrectomy and clamping of the left renal artery, and renal injury was established. Next, the surgery was performed on animals, which received the essential oil of *Lippzia alba* (200mg/kg- intraperitoneal). Blood, urine and renal tissue samples were collected for biochemical evaluations (creatinine, urea, uric acid, creatinine clearance, proteinuria and microalbuminuria) and antioxidant analyzes (MDA and GSH). The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará (n° 110/2017). In addition, an in vitro I/R model was performed using LLC-MK2 and HK-2 renal tubule cell lines for cell viability analysis by MTT reduction, as well as evaluation of cell ultrastructural changes by Electron Microscopy Scanning (SEM). Data were expressed as mean \pm standard error of the mean and as significance criterion was accepted $p < 0.05$. *Lippzia alba* essential oil presented the renal protection capacity in the in vivo experiment, reducing creatinine, urea, uric acid and increasing creatinine clearance in the treated groups, as well as reducing oxidative stress. In the in vitro assay, the oil was able to reverse the injury by I/R. With this, it was observed that the essential oil of *Lippzia alba* presented as a promising substance in the prevention or reduction of acute renal injury, since, through possible antioxidant mechanisms led to nephroprotection in the I/R models.

KEYWORDS: Acute Renal Injury; Ischemia; Reperfusion; *Lippzia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de estresse oxidativo por Isquemia e Reperusão	20
Figura 2 -	Estrutura básica do Isopreno	22
Figura 3 -	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae)	24
Figura 4 -	Estrutura molecular do limoneno	25
Figura 5 -	Moléculas de isômeros de citral: 5a (<i>trans</i> -geranial) e 5b (<i>cis</i> -neral)	25
Figura 6 -	Esquema de caracterização do estudo	31
Figura 7 -	Cálculo do Clearance de Creatinina	33
Figura 8 -	Reação de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
Figura 9 -	Reação para determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) pela ação de enzimas	35
Figura 10 -	Concentrações plasmáticas de Creatinina nos grupos experimentais	41
Figura 11 -	Concentrações plasmáticas de Uréia nos grupos experimentais	42
Figura 12 -	Concentrações plasmáticas de Ácido Úrico nos grupos experimentais	42
Figura 13 -	Clearance de Creatinina nos grupos experimentais	43
Figura 14 -	Valores de proteinúria dos grupos experimentais	45
Figura 15 -	Valores de microalbuminúria dos grupos experimentais	46
Figura 16 -	Níveis teciduais de MDA nos grupos experimentais	48
Figura 17 -	Níveis teciduais de TBARS nos grupos experimentais	48
Figura 18 -	Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	50
Figura 19 -	Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	52

Figura 20 - Percentual de viabilidade celular das células HK-2 tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	54
Figura 21 - Percentual de viabilidade das células HK-2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	56
Figura 22 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células HK-2 em condições de aerobiose	58
Figura 23 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células HK-2, submetidas ao processo de isquemia/reperfusão, não tratadas	59
Figura 24 - Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células HK-2, submetidas ao processo de isquemia/reperfusão, tratadas com o óleo essencial de <i>Lippia alba</i> (62,5 µg/mL)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos (<i>in vivo</i>)	32
Tabela 2 -	Composição do óleo essencial de folhas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo II	40
Tabela 3 -	Parâmetros bioquímicos renais	44
Tabela 4 -	Proteinúria e Microalbuminúria	46
Tabela 5 -	Determinações de MDA e GSH	49
Tabela 6 -	Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com várias concentrações do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> quimiotipo II	51
Tabela 7 -	Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetida; ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	53
Tabela 8 -	Percentagem de viabilidade celular das células HK-2 tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	55
Tabela 9 -	Percentual de viabilidade das células HK-2 submetidas ao modelo de I/R <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Lesão Renal Aguda	17
1.2 Estresse Oxidativo	18
1.3 Óleos Essenciais	21
1.3.1 <i>Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)</i>	22
1.3.2 <i>Lippia alba (Mill.) N.E.Brown</i>	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Colheita do material botânico, extração e análise do óleo essencial	30
4.1.1 Colheita	30
4.1.2 Extração do óleo essencial por arraste a vapor d'água	30
4.2 Delineamento experimental	30
4.3 Modelo <i>in vivo</i>	31
4.4 Os grupos experimentais	32
4.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	32
4.5.1 Cálculo do Clearance de Creatinina	33
4.6 Avaliação do estresse oxidativo no tecido renal	33
4.6.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)	33
4.6.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	34
4.7 Modelo <i>in vitro</i>	35
4.7.1 Cultivo de células renais LLC-MK2 e HK-2	35
4.7.2 Indução de I/R <i>in vitro</i>	36

4.7.3 Ensaio de redução do MTT	36
4.8 Avaliação das alterações morfológicas ultraestruturais	37
4.9 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotômetro de massa (CG-EM)	40
5.2 Estudo <i>in vivo</i>	41
5.2.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	41
5.2.2 Avaliação do estresse oxidativo no tecido renal	47
5.3 Estudo <i>in vitro</i>	49
5.3.1 Cultura de células renais e viabilidade celular	49
5.3.2 Avaliação das alterações morfológicas ultraestruturais	57
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Renal Aguda

A Lesão Renal Aguda (LRA) ocorre devido à perda rápida da função excretora do rim, sendo caracterizada pelo acúmulo de produtos do metabolismo do nitrogênio (uréia e creatinina) e/ou pela redução da produção de urina, bem como pelo acúmulo de ácidos metabólicos e aumento das concentrações de potássio e fosfato (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). Além disso, há alteração na regulação do volume de fluidos extracelulares, da concentração de substâncias osmoticamente ativas, do pH plasmático e da excreção de produtos indesejados do metabolismo e catabolismo hormonal, podendo haver, também, a desregulação da pressão sanguínea, e dos eletrólitos (MURUGAN, 2011).

Essa disfunção renal acomete um a cada cinco pacientes admitidos em emergências de hospitais. Estudos envolvendo internações hospitalares mostram que cerca de 20% da mortalidade nos hospitais é proveniente LRA e que essa taxa chega a ser de 50% em pacientes de unidades de terapia intensiva (KAM TAO LI; BURDMANN; MEHTA, 2013). Sendo assim, estima-se que cerca de 2 milhões de pessoas morrem de lesão renal aguda por ano (KANAGASUNDARAM, 2015).

A LRA pode ser dividida em três categorias: pré-renal, renal e pós-renal. Sendo que cada uma delas é responsável por diferentes mecanismos de disfunção renal. A LRA pré-renal é considerada comum em pacientes internados em hospitais e, em particular, em pacientes criticamente enfermos. Tal lesão ocorre quando há hipoperfusão renal leve a moderada, não havendo defeitos estruturais nos rins (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012); NUNES *et al* 2010). Essa redução na perfusão sanguínea é causada por diversos fatores, como hipotensão arterial, hipovolemia aguda, nos casos de diarreias, hemorragias e queimaduras, além disso, o uso de alguns medicamentos, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) podem levar a lesão aguda pré-renal (YU *et al.* 2007; NUNES *et al.* 2010).

A LRA renal ocorre quando se tem uma manutenção da situação de hipoperfusão renal, o que pode levar a necrose tubular aguda (NTA). Além disso, pode ser classificada em causas glomerulares (glomerulonefrites), vasculares (crise renal de escleroderme) e túbulo-intersticiais, sendo a categoria mais comum de lesão (YU *et al.* 2007; BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012; KANAGASUNDARAM, 2015).

Por fim, tem-se a LRA pós-renal que apresenta menor prevalência entre os três tipos descritos e exige a ocorrência de obstrução com repercussão renal bilateral, ou unilateral com rim único, como ocorre na obstrução uretral, do colo vesical, ureteral bilateral ou unilateral em rim único. Tal processo de lesão é reversível se houver a desobstrução precoce das vias urinárias (NUNES *et al.* 2010; KELLUM *et al.* 2008).

O processo de isquemia e reperfusão (I/R) contribui para a morbidade e mortalidade em inúmeras patologias, incluindo infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, lesão renal aguda, trauma, parada circulatória, doença falciforme e apnéia do sono (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). Tal mecanismo ocorre quando há diminuição ou suspensão do fluxo sanguíneo com redução ou ausência da oferta de oxigênio, que levará a um desequilíbrio na oferta e demanda metabólica dentro do órgão, acarretando em acúmulo de metabólitos e hipóxia tecidual. A restauração do fluxo sanguíneo para um tecido isquêmico, processo chamado de reperfusão, é responsável pelas principais lesões nas células dos órgãos isquemiados, visto que a reintrodução do sangue oxigenado nos tecidos isquêmicos pode levar a danos teciduais mais intensos que aqueles provocados pela isquemia (SHIMO *et al.* 2011; HARRIS *et al.* 2015).

O tempo de isquemia e a intensidade da reoxigenação determinam o grau de lesão, comprometendo, principalmente, os fosfolipídios da membrana celular (YAMAKI *et al.* 2012; BUSSMANN *et al.* 2014). O mecanismo de morte celular durante a I/R pode ocorrer pela ativação de diversas vias, como necrose, apoptose ou morte celular associada à autofagia (HOTCHKISS *et al.*, 2009).

A I/R é um dos principais fatores desencadeantes da LRA e envolve mecanismos como inflamação, danos vasculares e morte celular programada. Assim, apesar dos avanços clínicos e terapêuticos no âmbito da LRA, observa-se a necessidade da descoberta de novas alternativas farmacológicas capazes de diminuir os efeitos da Síndrome de Isquemia e Reperfusão, que é gerada pelo estabelecimento de estresse oxidativo no tecido, devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). (HU *et al.*, 2017); YAMAKI *et al.* 2012).

1.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo está relacionado a uma condição bioquímica do organismo, onde há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem ser produzidas devido a causas exógenas ou endógenas. Quando a geração de EROs

ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, instala-se o processo de estresse oxidativo (PRADO, 2012). Esse mecanismo, que se dá pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa endógena antioxidante, é considerado como fator determinante para a iniciação e progressão da injúria renal, visto que causa alterações membranares irreversíveis na célula, podendo alterar também proteínas e DNA (HALIWELL, 2007; KALANTARI *et al.* 2018).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas devido ao fato de possuírem elétrons desemparelhados na sua última camada. A presença desses compostos reativos poderá levar a dano celular grave devido ao processo de estresse oxidativo. Porém, em alguns casos, a presença de radicais livres se torna benéfica, como, por exemplo, na cascata de sinalização celular e nas mudanças dos padrões de expressão gênica (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997; YAHYAPOUR *et al.*, 2018).

A lesão por isquemia e reperfusão está intimamente ligada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Durante a isquemia, devido a privação de oxigênio, a molécula de adenosina trifosfato (ATP) é degradada em adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), ao longo do tempo do processo o AMP é metabolizado em nucleotídeos como, adenosina e em hipoxantina. A xantina desidrogenase se converte em xantina oxidase devido à presença de cálcio intracelular produzido na isquemia. A seguir, temos o processo de reperfusão, que leva a conversão da hipoxantina em xantina pela ação enzimática da xantina oxidase, gerando EROs, como ânions superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (**Figura 1**) (KIETZMANN *et al.* 2000; DEVARAJAN, 2006; BUSSMANN *et al.* 2014).

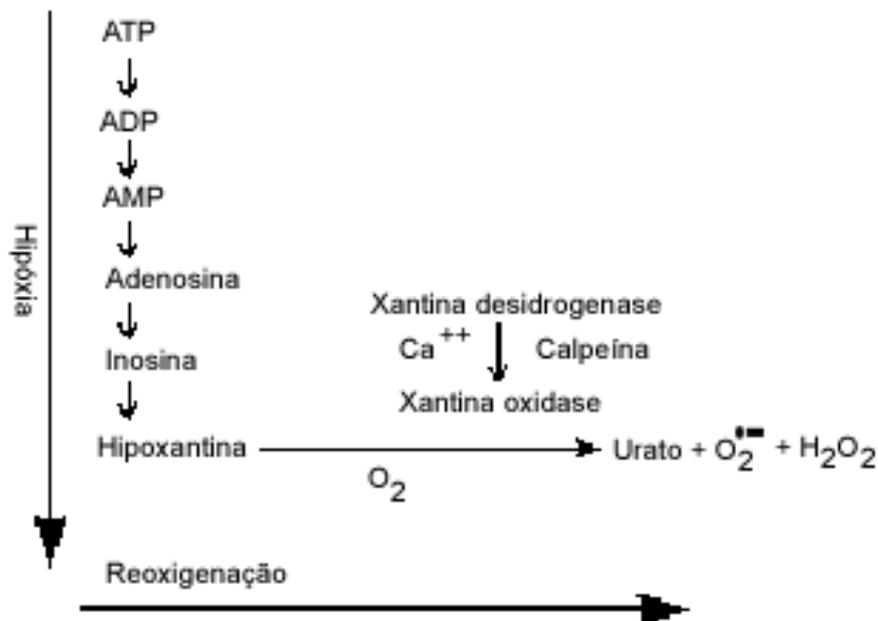


Figura 1: Mecanismo de estresse oxidativo por Isquemia e Reperusão

Fonte: Castro & Silva Jr. *et al.* (2002).

A LRA ocorre devido às alterações causadas por espécies reativas de oxigênio nas células tubulares renais por processos de oxidação protéica, peroxidação lipídica, danos ao DNA e indução de morte celular programada (BUSSMAN *et al.* 2014).

A LRA isquêmica provoca uma série de mudanças, principalmente, tubulares. Essas alterações envolvem morfologia, hemodinâmica, metabolismo e estrutura das células tubulares, processos inflamatórios e outros, que levam a danos severos as células renais (DEVARAJAN, 2006).

O organismo possui agentes antioxidantes endógenos, que agem como protetores aos danos causados pelo estresse oxidativo e produção de radicais livres. Essas defesas podem ser classificadas em sistemas enzimáticos, envolvendo enzimas como a glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, e sistemas não enzimáticos, como glutathiona reduzida, peptídeos de histidina, bilirrubina e outros. Além disso, existem, ainda, antioxidantes exógenos, como vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E, β -carotenos, flavonóides, polifenóis, taninos e outros, obtidos através da alimentação (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SIES, 2015).

Substâncias naturais antioxidantes são amplamente pesquisadas para tratar lesão por isquemia e reperfusão causadas por estresse oxidativo. Estudos mostram atividades comprovadas de moléculas isoladas de óleos essenciais, como camomila e,

até mesmo, extratos oriundos de plantas, tal como o propólis, utilizadas como ferramentas para melhorar ou reverter esse tipo de lesão (DA COSTA *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016). Assim, observa-se a importância de se estudar os óleos essenciais oriundos de plantas nativas do Brasil, visto que os mesmos já possuem atividade antioxidante previamente descritas.

1.3 Óleos essenciais.

Os óleos essenciais são componentes voláteis extraídos de diversas partes de plantas, como folhas, cascas, sementes e fruto e que podem conter de 20 a 60 componentes em concentrações variadas. Seu uso é datado há milênios na literatura antiga. São caracterizados, principalmente, por possuírem um odor característico, que varia de acordo com os tipos e quantidades dos constituintes de cada óleo. Esses compostos podem ser extraídos de diversas maneiras, sendo a escolha do método de extração baseada na parte da planta utilizada. A extração deve ser um procedimento cauteloso, visto que deve preservar as características farmacológicas, organolépticas e químicas dos óleos essenciais (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014); (BAKKALI *et al.*, 2008).

A utilização de óleos essenciais é bastante ampla, tais compostos são usados na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Na área de cosméticos, os óleos essenciais são empregados, principalmente, como fragrâncias e fixadores de fragrâncias. Suas atividades antimicrobianas e antioxidantes levam a sua aplicação na área de alimentos, além do uso como flavorizantes em preparações como sucos. Na indústria farmacêutica são utilizados como coadjuvantes em medicamentos. (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; SILVA *et al.* 2006).

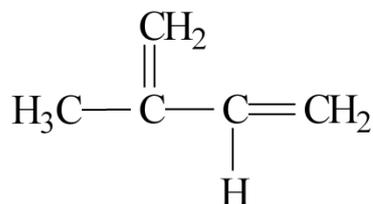
Dentre as diversas atividades desempenhadas pelos óleos essenciais, a antioxidante se destaca, visto que tem importância significativa nas funções biológicas apresentadas por essas substâncias, que são ricas em fenóis, moléculas que atuam como antioxidantes em compostos orgânicos através da alta reatividade com radicais peróxidos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Os componentes dos óleos essenciais podem ser classificados em dois principais grupos: terpenóides e fenilpropanóides (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Os terpenos são um grupo de compostos que desempenha papel importante na fisiologia vegetal, regulando o desenvolvimento e o crescimento das plantas (SCHNERMANN; SHENVI, 2015). Além disso, apresentam funções hormonais em

animais, sendo chamados de fitoesteróis. Em frutos, folhas e legumes conferem odores e cores específicas de cada tipo de terpeno. São formados por unidades de isopreno, sendo divididos em monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos (NIEDERBACHER; WINKLER; SCHNITZLER, 2015);

Os monoterpenos (C10) são formados a partir de duas unidades de isopreno (**Figura 2**), que são as unidades de formação de terpenos, presentes em 90% dos óleos essenciais existentes na natureza. Tais compostos possuem estruturas voláteis e lipofílicas, o que os permite alta penetração na membrana plasmática, visto que são apolares (OZ *et al.*, 2015). Estudos mostram que esses terpenos apresentam diversas atividades terapêuticas, como antibacteriana, antifúngica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antioxidante e outras. São muitos os exemplos de monoterpenos existentes em óleos essenciais, dentre eles tem-se geranial (*cis* citral), neral (*trans* citral), citronelol e outros. Já os sesquiterpenos são formados por três moléculas de isoprenos, totalizando quinze carbonos em suas estruturas (BARRETO *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2013).

Figura 2: Estrutura básica do Isopreno



| **Fonte:** Bakkali *et al.* (2008).

Esses componentes dos óleos essenciais têm sido caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (CG-EM). Essa metodologia auxilia, tanto qualitativamente como quantitativamente, na caracterização dos diferentes quimiotipos de algumas espécies.

1.3.1 Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa consiste em uma técnica cromatográfica que tem como princípio a diferença de distribuição de substâncias de uma mistura entre duas fases não miscíveis. Essas fases são denominadas: fase móvel e fase estacionária. A fase móvel é constituída por um gás, o qual se move através de uma coluna, onde está

contida a fase estacionária. O processo se dá através do arraste dos constituintes da substância pelo gás para dentro da coluna, a partir daí o constituinte apresentará um tempo de retenção maior ou menor, devido a sorção ou desorção sobre a fase estacionária. A principal aplicação desse método é na identificação, determinação quantitativa de substâncias e teste de pureza de substâncias diversas (BRASIL, 2010).

O espectrômetro de massas tem se tornado um componente essencial na descoberta e estudo de novas drogas (BU *et al.*, 2014). Tal aparelho é constituído, geralmente, por três componentes principais: uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector. A fonte de íons é responsável pela ionização do analito, que será contado no detector. Já o analisador de massas é o responsável pela determinação da relação massa/carga das partículas de íons, sendo, portanto, o analisador o componente essencial para a avaliação da massa das substâncias analisadas (HAAG, 2016).

A análise do óleo essencial foi realizada por CG-EM acoplado a um analisador de dados informatizado. Os constituintes foram identificados utilizando-se Índices Kowats como pré-seleção e interpretação dos respectivos espectros de massas. As confirmações foram feitas por meio de comparação visual dos registros das fragmentações (m/z) com padrões da literatura.

1.3.2 *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown

A *Lippia alba* (**Figura 3**) é uma planta pertencente à família *Verbenaceae*, caracterizada por possuir mais de 2800 espécies existentes em países de clima tropical e subtropical. No Brasil há grande diversidade em espécies do gênero *Lippia* totalizando cerca de 120 espécies, onde a *Lippia alba* é popularmente conhecida como erva-cidreira, podendo também ser chamada de alecrim selvagem, falsa melissa, salva limão e outros (BARROSO, 1991; STASHENKO *et al.*, 2013).

O óleo essencial da cidreira possui diversas propriedades farmacológicas comprovadas, dentre elas: antioxidante, analgésicas e anti-inflamatórias, antibacterianas, ansiolíticas, antiespasmóticas e outras (BLANCO *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2017; TONI *et al.*, 2015). Dentro da medicina popular, essa planta é bastante utilizada, estudos mostram que, em estados brasileiros, a *Lippia alba* foi a sétima espécie mais utilizada por curandeiros e usuários de plantas medicinais, que afirmavam utilizá-la, na forma de infusão, para hipertensão, problemas digestivos,

náusea, para curar feridas e como xarope contra tosse e bronquite (HENNEBELLE *et al.* 2008).

Essa espécie vegetal possui uma grande variedade de quimiotipos difundidos pelo mundo, porém no Brasil, especificamente, no Nordeste foram caracterizados três principais quimiotipos da planta, através de estudos realizados por Matos *et al.* (1996), onde foram demonstradas propriedades químicas, farmacognósticas e farmacológicas dessas cidreiras (HENNEBELLE *et al.*, 2008; VALE *et al.*, 1999).

Figura 3 - *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae)



Fonte: Teixeira (2015)

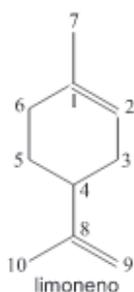
A classificação dos quimiotipos de *Lippia alba* está relacionada, principalmente, com as variações químicas na composição de seus óleos essenciais, que podem ser atribuídas aos fatores ambientais, como clima, solo e até mesmo época de colheita das plantas. Essa divisão é dada de acordo com os componentes químicos majoritários de cada quimiotipo. No Ceará, observa-se a existência de três principais quimiotipos da erva cidreira: quimiotipo I, que possui óleo essencial com elevados teores de mirceno e citral; quimiotipo II, com altas quantidades de limoneno e citral e, por fim, quimiotipo III, rico em limoneno, carvona e com ausência de citral (MATOS *etal.* 1996; SANTOS *et al.* 2016; DA COSTA *et al.* 2015; SILVA *et al.* 2006).

O quimiotipo II possui óleo essencial rico em limoneno e citral (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011; VALE *et al.*, 1999). O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é o componente majoritário do óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II, sendo responsável por, aproximadamente, 63% da composição dessa substância. O limoneno (1-metil-4-(prop-1-en-2-il)ciclohex-1-eno) (**Figura 4**) é um monoterpene também presente no óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II, que confere odor característico a esses óleos. Além disso, estudos mostraram que o limoneno possui

atividades antitumoral, antibiótica e antiprotozoária (ARRUDA *et al.*, 2009; XIA *et al.*, 2013).

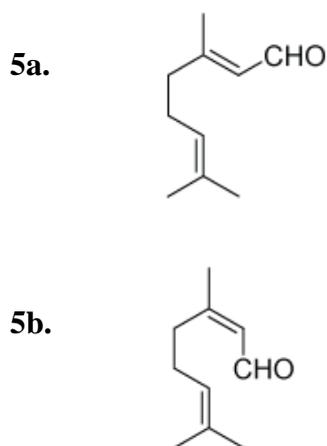
A molécula do citral é composta por dois aldeídos monoterpênicos isoméricos, denominados *trans*-geranial (**Figura 5a**) e *cis*-neral (**Figura 5b**) (DANGKONG; LIMPANASITHIKUL, 2015). Diversos estudos foram documentados, utilizando óleos essenciais contendo citral, mostrando que esse composto apresenta atividade anti-inflamatória, anticâncer, antimicrobiana, antioxidante e efeito renoprotetor em glomeruloesclerose (YANG *et al.* 2013 ;DANGKONG; LIMPANASITHIKUL, 2015). Estudos demonstraram, ainda, que óleos essenciais, contendo altas concentrações de neral e geranial foram capazes de reduzir, satisfatoriamente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), quando comparados com antioxidantes, como ácido ascórbico e BHT (EHSANI *et al.*2017).

Figura 4 – Estrutura molecular do limoneno.



Fonte: Maróstica (2007)

Figura 5- Moléculas de isômeros de citral: 5a (*trans*-geranial) e 5b (*cis*-neral).



Fonte: Furlan *et al.*, (2010)

Assim, observando as características farmacológicas já apresentadas na literatura pela *Lippia alba* quimiotipo II e seus componentes, pretende-se avaliar a

atividade nefroprotetora do seu óleo essencial contra lesão renal aguda causada por processos de isquemia e reperfusão (I/R).

2. JUSTIFICATIVA

A I/R é um fenômeno complexo, que contribui para a mortalidade e morbidade, assim como é um fator predisponente para o estabelecimento da LRA, a qual é uma das disfunções orgânicas mais comuns (HARRIS *et al.*, 2015). A injúria por I/R é o principal fator etiológico da LRA (YAMAKI *et al.* 2012). Os antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem a oxidação de um substrato de maneira eficaz, sendo considerados agentes responsáveis pela inibição, redução e reparação de lesões causadas pelos radicais livres nas células, podendo ser utilizados para reduzir o dano causado por estresse oxidativo na I/R (ANDRADE *et al.* 2012). Assim, existe a necessidade de buscar novas substâncias com propriedades antioxidantes, capazes de diminuir os efeitos das lesões causadas por radicais livres.

O óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II possui constituintes majoritários, tais como neral (cis-citral), geranial (trans-citral) e limoneno, descritos anteriormente como substâncias que possuem atividades antioxidantes (BASCHIERI *et al.*, 2017; BOUZENNA *et al.*, 2017). Podendo-se inferir que a mistura desses componentes nas proporções do óleo essencial podem promover efeitos antioxidantes diferentes daqueles apresentados pelos componentes isolados. Dessa forma, se observa a importância do estudo, utilizando o óleo essencial da *Lippia alba*, que, como descrito previamente, possui componentes com atividades antioxidante e anti-inflamatória comprovadas, sendo possivelmente uma substância que pode auxiliar na defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos no processo de isquemia/reperfusão na Lesão Renal Aguda (LRA).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos nefroprotetores do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown quimiotipo II na Lesão Renal Aguda (LRA) em modelos de Isquemia/Reperusão (I/R).

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar os possíveis efeitos nefroprotetores do óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II na Lesão Renal Aguda (LRA) por I/R através da determinação de parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no tecido renal;
- Avaliar o efeito do óleo essencial da *Lippia alba* quimiotipo II em células renais LLC-MK2 e HK2 pela viabilidade celular;
- Avaliar a morfologia de células HK-2 isquemiadas e tratadas com o óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Colheita do material botânico, extração e análise do óleo essencial.

4.1.1 Colheita

Os exemplares de *Lippia alba* foram coletados às 9 horas da manhã no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos e o óleo essencial foi extraído no Laboratório de Farmacognosia do Horto, localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsicata encontra-se registrada no Herbário Prisco Bezerra da UFC com número 38.174.

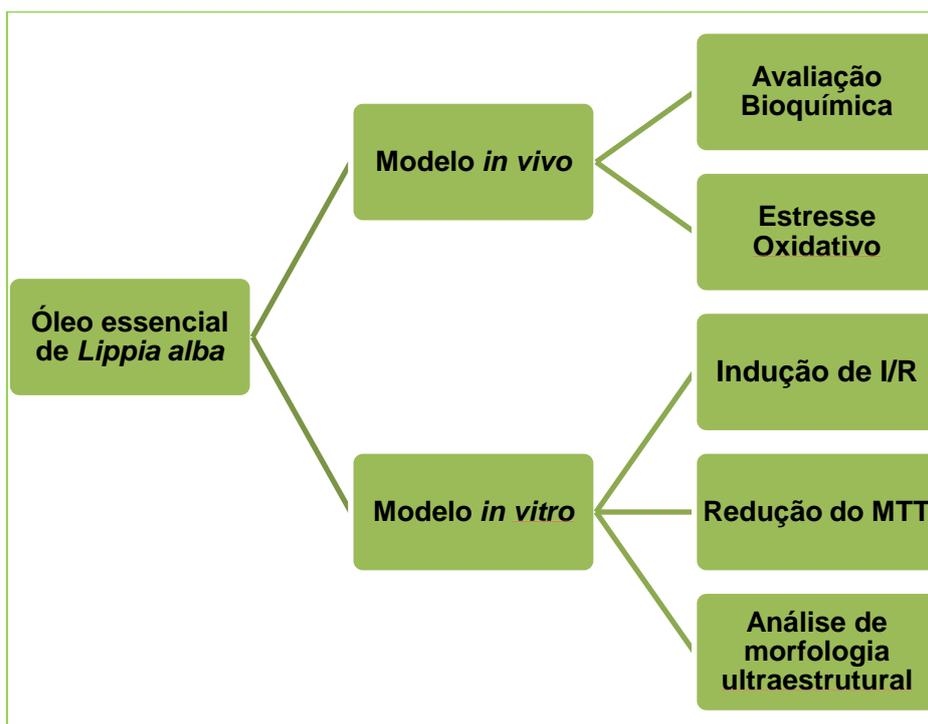
4.1.2 Extração do óleo essencial por arraste a vapor d'água

A extração realizada no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Ceará (UFC) deu-se através da utilização das folhas frescas, dessecadas a sombra que foram trituradas (1kg), e colocadas separadamente em frasco acoplado a um condensador e a uma fonte geradora de vapor d'água para extração do óleo essencial por arraste a vapor. Finalizada a operação, o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro, com o intuito de retirar a umidade, e analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

4.2 Delineamento experimental

O presente trabalho avaliou o efeito protetor do óleo essencial da *Lippia alba*, sobre a LRA em modelos de I/R. O estudo foi dividido em duas principais etapas, denominadas respectivamente, etapas *in vivo* e *in vitro* (Figura 6).

Figura 6: Esquema de caracterização do estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Modelo *in vivo*

Foram utilizados Ratos Wistar machos com aproximadamente 200-250g que foram mantidos sob condições controladas (25 ± 2 ° C, ciclo claro-escuro de 12 horas). Comida e água foram fornecidas *ad libitum*.

Foi realizada a cirurgia de Isquemia/Reperusão com o objetivo de estabelecer o processo de I/R em LRA, através da anestesia prévia dos animais, utilizando Ketamina 10% (100 mg/kg) e Xilazina 2% (10mg/kg). Depois de anestesiados, os animais foram submetidos a uma laparotomia através de uma incisão na linha média, onde foi removido o rim direito. O processo de isquemia foi induzido no rim esquerdo pelo clampeamento, que causou oclusão unilateral da artéria renal, durante 60 minutos, seguido do restabelecimento do fluxo sanguíneo renal e por 48 horas de reperusão, como descrito anteriormente por Da Costa *et al.*, (2015) e Najafi *et al.*, (2014). Os animais foram mantidos aquecidos a uma temperatura constante de aproximadamente 36°C durante as cirurgias e por fim, foi realizada uma sutura no local da incisão com fio de sutura de polipropileno 4.0. As cirurgias foram realizadas de maneira igual em grupos denominados “SHAM” (falso operados), excluindo-se a nefrectomia direita e o clampeamento da artéria renal. Durante as últimas 24 horas da

reperfusão, as amostras de urina foram obtidas com a utilização de uma gaiola metabólica. Ao final do tempo programado de 48 horas, os animais foram novamente anestesiados para obtenção de amostras de sangue para realização de exames bioquímicos e dosagem de biomarcadores e o rim esquerdo foi retirado para avaliação de parâmetros, que avaliam o estresse oxidativo no tecido.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC) (nº 110/2017) conforme o que é preconizado pelas diretrizes éticas.

4.4 Os grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6), onde todos foram tratados por gavagem oral, uma vez ao dia, por 3 dias antes da realização do processo cirúrgico (I/R) com o óleo essencial de *Lippia alba*, que foi diluído em solução aquosa de DMSO 2% na dose de 200mg/kg (DA COSTA *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016).

Tabela 1: Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos (*in vivo*)

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Administração através de gavagem
SHAM	Falso-Operado	Veiculo (DMSO)
SHAM + <i>Lippia alba</i>	Falso Operado	<i>Lippia alba</i> (200mg/kg)
Isquemia/reperfusão (I/R)	Isquemia/Reperfusão	Veiculo (DMSO)
I/R + <i>Lippia alba</i>	Isquemia/Reperfusão	<i>Lippia alba</i> (200mg/kg)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

As amostras de sangue obtidas através da coleta nos animais foram centrifugadas (4500 rpm durante 10 minutos) para obtenção de plasma. Os parâmetros bioquímicos foram aferidos utilizando um equipamento de análise automático (Roche

Diagnostics Limited, Rotkreuz Suíça). Foram determinadas proteinúria, microalbuminúria, creatinina urinária e níveis plasmáticos de uréia, ácido úrico e creatinina

4.5.1 Cálculo do Clearance de Creatinina.

Figura 7: Fórmula para cálculo do clearance de creatinina.

$$ClCr = \frac{Cr \text{ urinária (mg/dL)} \times V \text{ urina 24h (ml)}}{Cr \text{ plasmática (mg/dL)} \times \text{Tempo (min)}}$$

Legenda: ClCr (mg/dl) = clearance de creatinina; Vurina 24h (ml)= volume de urina em 24 horas; Cr plasmática (mg/dl) = Creatinina plasmática.

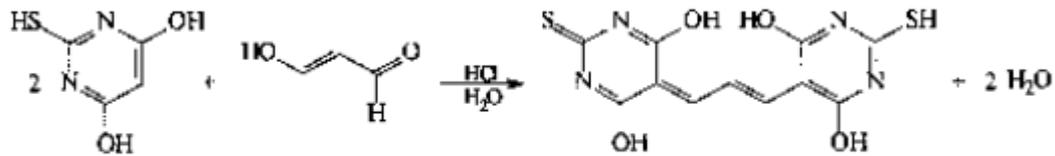
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Avaliação do estresse oxidativo no tecido renal

4.6.1 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

O Malondialdeído (MDA) representa as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) que são formadas através de reações de peroxidação lipídica (HARDWICK *et al.*, 2010). A concentração de MDA no tecido renal foi determinada como um indicador dessa peroxidação lipídica, utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (UCHIYAMA; MIHARA, 1978) em amostras de homogenato de tecido renal. O processo se dá através da reação de uma molécula de MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) para a formação de um complexo de coloração avermelhada, que absorve a 535-535 nm (**Figura 8**) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Realizou-se um homogenato com os fragmentos do rim esquerdo, utilizando tampão fosfato 150mM, após preparado o homogenato adicionou-se ácido tiobarbitúrico a preparação. Tal mistura foi incubada a 96°C por 20 minutos para a formação de um cromógeno cor-de-rosa, que foi lido a 532 nm por espectrofotômetro (UV ASYS 340, Biochrom, Cambrigde, Reino Unido). Os resultados encontrados foram expressos em µg/g de tecido.

Figura 8: Reação de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)



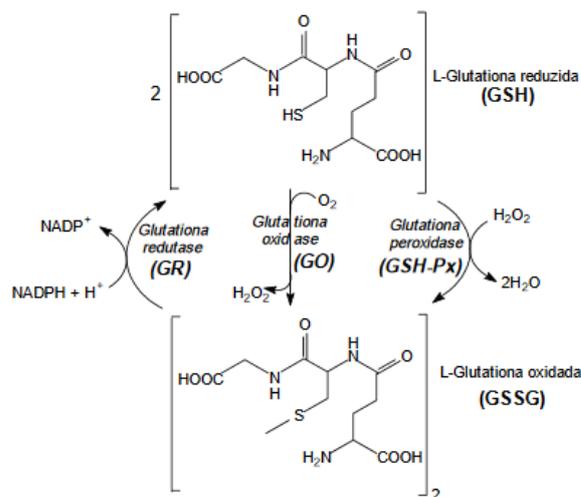
Fonte: Silva; Borges; Ferreira, (1999).

4.6.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

O princípio do ensaio para determinação de níveis de GSH se baseia na reação entre duas moléculas de GSH, que doam um elétron cada uma para a glutathiona oxidada (GSSG), que pode ser reduzido novamente ao GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR) (**Figura 9**). O desequilíbrio redox é evidenciado pela baixa proporção das concentrações das moléculas de GSH e GSSG (GSH/GSSG). Já foram descritos na literatura, que essa relação baixa entre as moléculas anteriormente descritas está presente em doenças como insuficiência renal, pneumonia, doença de Alzheimer e outras (GIUSTARINI *et al.*, 2013); DALLE-DONNE *et al.* 2008)

Na determinação da glutathiona reduzida (γ -glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH), o homogenato do tecido foi preparado com 0,02 M de EDTA. As amostras foram misturadas ao ácido tricloroacético a 50%, centrifugadas (3000 rpm, 15 min), 400 μ L do sobrenadante foi adicionado a 800 μ L de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 μ L de DTNB (5, 5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)). Por fim, a absorvância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados foram expressos em μ g/g de tecido.

Figura 9: Reação para determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) pela ação de enzimas.



Fonte: Júnior *et al.* (2001).

4.7 Modelo *in vitro*

4.7.1 Cultivo de células renais LLC-MK2 e HK2

As células epiteliais tubulares renais LLC-MK2, uma linhagem imortalizada de células de túbulo proximal de macacos e as células do túbulo proximal de humanos HK2, foram doadas pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo e cultivadas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Invitrogen, EUA, contendo de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ para que fossem confluentes (BUTLER e DAWSON, 1992).

O processo de manutenção das células se deu de acordo com protocolo anteriormente padronizado (SAMPAIO *et al.* 2016), no qual o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7,4. A garrafa de cultivo foi incubada com 1 mL de solução de tripsina-EDTA (0,05%/0,02%) por 5 minutos a 37°C para o descolamento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA foi adicionado 2 mL de DMEM completo (contendo soro bovino fetal a 10%) e quantidades pequenas

das suspensões celulares foram adicionadas a novas garrafas de cultivo, contendo o meio DMEM.

Inicialmente, ao começo de um novo experimento, as células foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Depois, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM completo. Para cada experimento, as células foram quantificadas, ajustadas para a concentração 1×10^5 células/mL e plaqueadas.

4.7.2 Indução de I/R in vitro

O método *in vitro* de isquemia/reperfusão, utilizando câmara anaeróbica, foi descrito por Gino *et al.* (2014). As células foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços e mantidas 24 horas incubadas, para permitir adesão e proliferação celular. Para a indução de isquemia, o meio de cultura DMEM normal foi trocado por DMEM privado de glicose, piruvato e SBF. Após isso, as placas foram incubadas em câmara anaeróbica por 24 horas. A reperfusão foi realizada, após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células a atmosfera de 5% de CO₂ por 3 horas.

As placas foram tratadas com o óleo essencial da *Lippia alba*, após 3 horas de reperfusão, nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL, que foram obtidas através da diluição do óleo essencial em DMSO, respeitando a concentração máxima de 0,5%. A partir da solução-mãe produzida foram feitas as diluições, obtendo as concentrações anteriormente descritas. A seguir, foram realizados todos os experimentos, envolvendo a linhagem celular.

4.7.3 Ensaio de redução de MTT

Para determinar a viabilidade celular, foi realizado o teste de redução do [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (Sigma®). Esse teste baseia-se na capacidade metabólica de células viáveis, com consequente formação de um produto insolúvel de cor azul violácea, chamado formazan. (MOSMANN, 1983).

As células foram submetidas ao processo de isquemia/reperfusão anteriormente descritos e após o tratamento com as diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com MTT (2,5mg/ml de PBS estéril), onde, após a retirada de 100µL de cada poço, tanto os tratados como os controles (tratados apenas com PBS estéril) da placa foram adicionados 10 µL de MTT (Sigma ®) e após 4 horas, na incubadora a 37°C e ambiente escuro, 90 µL de docecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Assim, após 17 horas, foi realizada a leitura por espectrofotometria em 570nm.

4.8 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais

As alterações na superfície celular foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Tal procedimento consiste em através de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro avaliar a superfície da amostra, detalhadamente, transmitindo, assim, o sinal de um detector a uma tela catódica que tem sua varredura sincronizada com aquela do feixe incidente.

As células HK-2 foram incubadas de acordo com o método de indução de lesão *in vitro* por isquemia/reperfusão, onde foram plaqueadas em uma concentração de 5×10^4 células/mL em placas de 24 poços e mantidas 24 horas incubadas. Para a indução de isquemia, o meio de cultura DMEM normal foi trocado por DMEM privado de glicose, piruvato e SBF. A seguir, as placas foram incubadas em câmara anaeróbica por 24 horas. A reperfusão foi realizada, após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células a atmosfera de 5% de CO₂ por 3 horas. As placas foram tratadas com as seguintes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*: 62,5 µg/mL e 125 µg/mL.

Após a incubação, as células foram fixadas por 2 horas com 2,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania), lavadas duas vezes com PBS e duas vezes com água destilada centrifugando-se a 800g por 10 min. A seguir, as amostras foram desidratadas e séries crescentes de etanol (30-100%), colocadas em lamínulas de vidro, fixadas a 37°C com 5% de CO₂, cobertas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, USA) (MELLO *et al.*, 2017). As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador na Central Analítica – UFC utilizando o Software Nis 4.0.

4.9 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos com media \pm erro padrão da média (SEM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito $*p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise por CG-EM permitiu a identificação de vinte constituintes, dentro os quais foram observados como majoritários Geranial (*trans*-citrál) (39,6%), Neral (*cis*-citrál) (28,79 %), e Limoneno (10,05%), levando a confirmação de que o óleo essencial de *Lippia alba* analisado seria o quimiotipo II. Esses componentes são apresentados na Tabela 2, com seus respectivos tempos de retenção (Tr) e porcentagem (%).

Tabela 2: Composição do óleo essencial de folhas de *Lippia alba*, quimiotipo II.

Nº	COMPONENTES	TR (min)	%
1	Sabineno	14.556	0.66
2	6-metil-5-hepten-2-ona)	15.166	0.73
3	p-cimeno	17.517	2.85
4	Limoneno	17.835	10.05
5	γ -Terpineno	19.555	2.19
6	Linalol	21.908	0.90
7	β -copaeno	25.831	1.46
8	Óxido de linalol	26.923	1.99
9	α -Copaeno	29.724	0.88
10	Neral (<i>cis</i>-citrál)	30.751	28.79
11	Naftaleno	30.949	2.48
12	Geranial (<i>trans</i>-citrál)	32.511	39.60
13	Nerol	33.426	0.54
14	Germacreno	44.902	2.18
15	γ -muroleno	46.391	0.49
16	Elemol	47.187	1.31
17	Nerolidol	47.320	0.79
18	Óxido de cariofileno	47.929	0.56
19	Guaiol	48.067	0.56
20	β -eudesmol	48.847	0.98

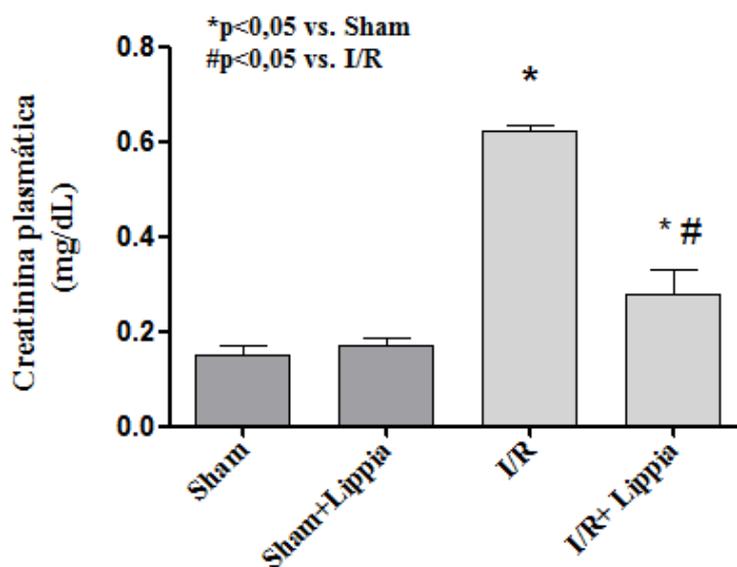
Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Estudo *in vivo*

5.2.1 Avaliação de parâmetros bioquímicos

Para avaliar possíveis alterações renais foram mensurados parâmetros bioquímicos dos animais em estudo e foi observado um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de creatinina ($0,62 \pm 0,01$) (Figura 10), uréia ($93 \pm 10,21$) (Figura 11) e ácido úrico ($2,46 \pm 0,43$) (Figura 12) no grupo submetido ao processo de isquemia e reperfusão (I/R), bem como uma redução (29,45%) no clearance de creatinina ($0,43 \pm 0,08$) (Figura 13), o que indica o estabelecimento da LRA nesse grupo, quando comparado ao Sham. Por conseguinte, nota-se a proteção da lesão após o tratamento com o óleo essencial de *Lippia alba* (I/R+Lippia). A tabela 3 mostra os dados numéricos referentes às determinações bioquímicas.

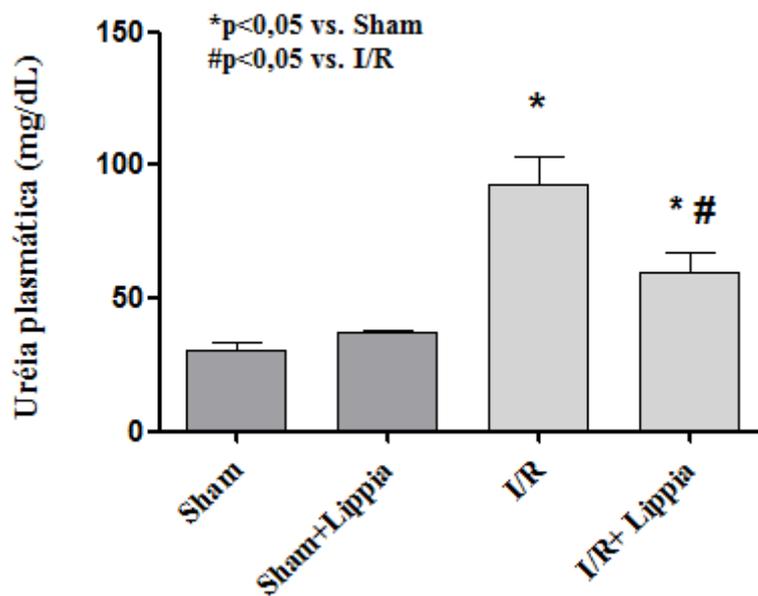
Figura 10: Concentrações plasmáticas de Creatinina dos grupos experimentais.



Legenda: Os experimentos foram realizados com $n=6$ e os dados expressos em média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

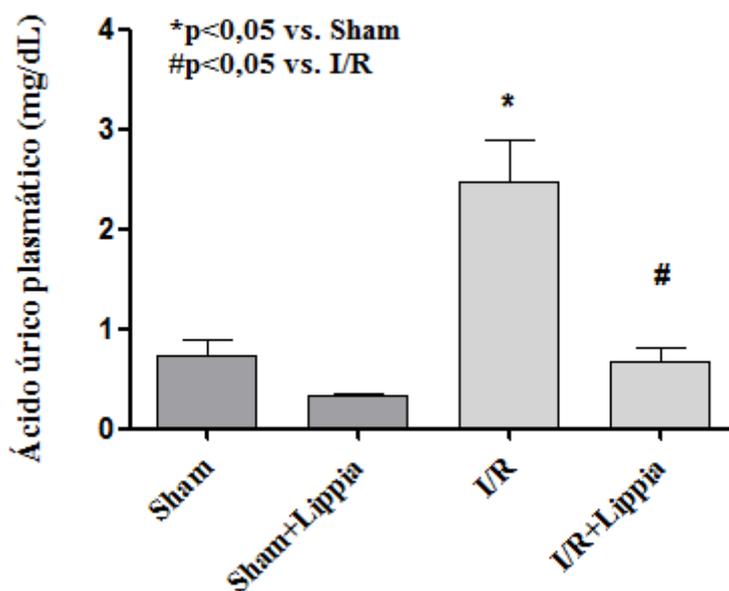
Figura 11: Concentrações plasmáticas de Uréia dos grupos experimentais.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=6 e os dados expressos em média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

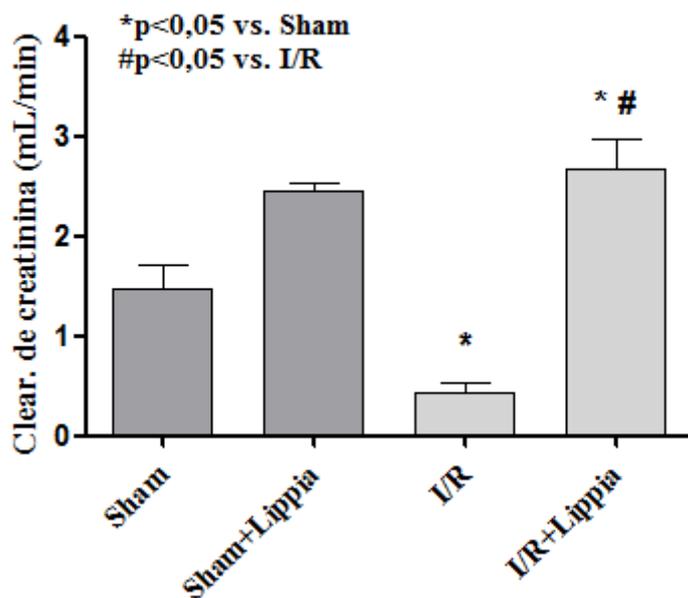
Figura 12: Concentrações plasmáticas de Ácido Úrico dos grupos experimentais.



Legenda: Os experimentos foram realizados com $n=6$ e os dados expressos em média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 13: Clearance de Creatinina dos grupos experimentais



Legenda: Os experimentos foram realizados com $n=6$ e os dados expressos em média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3: Parâmetros bioquímicos renais.

Grupos	Creatinina plasmática (mg/dL)	Uréia plasmática (mg/dL)	Ácido úrico plasmático (mg/dL)	Clearance de Creatinina (mL/min)
Sham	0,15±0,01	30,6±2,94	0,72±0,16	1,46±0,24
Sham+Lippia	0,17±0,01	37,5±0,86	0,32±0,02	2,45±0,08
I/R	0,62±0,01	93±10,21	2,46±0,43	0,43±0,08
I/R+Lippia	0,28±0,04	59±7,4	0,67±0,13	2,67±0,3

Legenda: Os dados estão expressos como média padrão ± EPM, $p < 0,05$.

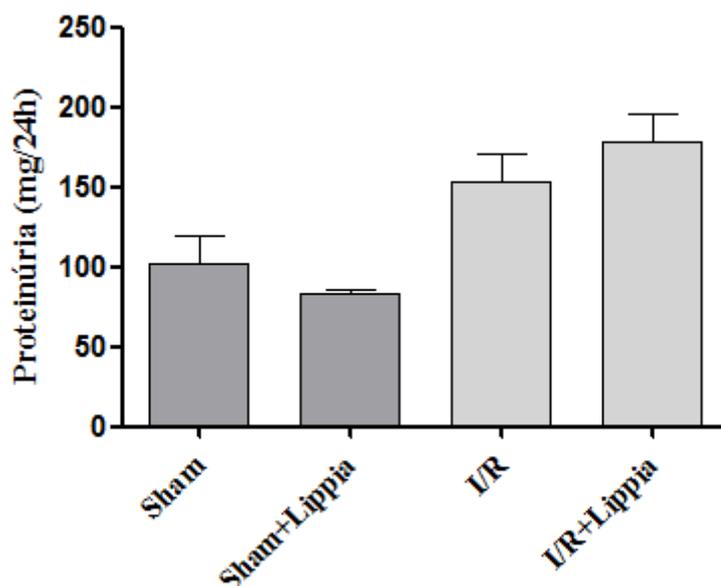
I/R= isquemia/reperfusão; I/R+Lippia alba= isquemia/reperfusão+Lippia alba.

Fonte: Dados da pesquisa.

Dando seguimento ao estudo, foram observados os valores de proteínas urinárias (proteinúria) e microalbuminúria que também são marcadores do estabelecimento de LRA.

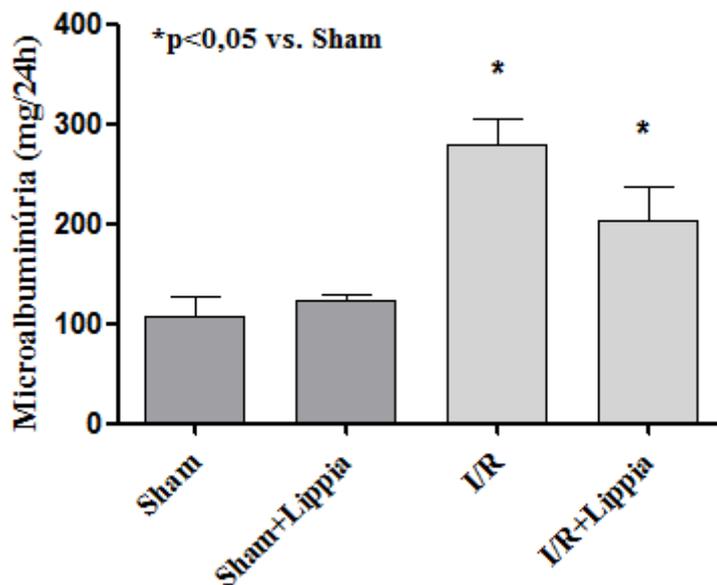
Os valores referentes à proteinúria (Figura 14) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Quando analisadas as microalbuminúrias (Figura 15) foi observado um aumento nos níveis da microalbuminúria dos grupos experimentais que sofreram isquemia e reperfusão (I/R e I/R+Lippia) quando comparados ao grupo Sham. Os dados numéricos relativos a proteinúria e a microalbuminúria estão apresentados na tabela 4.

Figura 14: Valores de proteinúria dos grupos experimentais.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=6 e os dados expressos como média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 15: Valores de microalbuminúria dos grupos experimentais.

Legenda: Os experimentos foram realizados com n=6 e os dados expressos como média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 4: Proteinúria e Microalbuminúria.

Grupos	Proteinúria (mg/24h)	Microalbuminúria (mg/24h)
Sham	102.7 \pm 16.3	108.1 \pm 19.5
Sham+Lippia	82.88 \pm 3.4	123.9 \pm 5.5
I/R	280.7 \pm 17.1	279.3 \pm 25.7
I/R+Lippia	289.1 \pm 17.4	204.1 \pm 33.8

Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, $p < 0,05$. I/R= isquemia/reperfusão; I/R+Lippia= isquemia/reperfusão+Lippia alba.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.2 Avaliação do estresse oxidativo no tecido renal

O óleo essencial de *Lippia alba*, assim como a maioria dos óleos essenciais, apresenta constituintes com propriedades antioxidantes descritas, como anteriormente relatado nesse trabalho. Assim, na busca de possíveis mecanismos para o efeito nefroprotetor desse óleo no modelo de I/R *in vivo* é importante, que se realizem estudos envolvendo o equilíbrio óxido-redutor.

Como dito anteriormente, o processo de isquemia leva a produção de enzimas importantes para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e para a peroxidação lipídica. Essas EROs, entretanto, são formados, principalmente, durante o processo de reperfusão do tecido isquemiado.

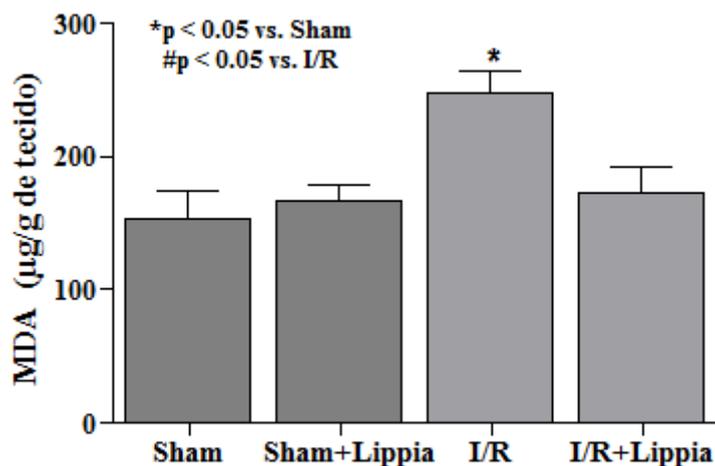
Assim, se torna interessante estudar a influência da indução de LRA por I/R no equilíbrio óxido-redutor (redox) no tecido renal, bem como as alterações relacionadas ao grupo de animais tratados com o óleo essencial em estudo. Conforme dito anteriormente, as técnicas utilizadas foram a avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio do TBARS e a avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).

A figura 16 mostra as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) representadas pelo malondialdeído (MDA), onde foi observado que houve aumento significativo na formação de TBARS no grupo I/R, indicando a formação de EROs e ocorrência de estresse oxidativo após a lesão. O tratamento com o óleo essencial de *Lippia alba* levou a uma tendência à redução das TBARS, indicando possível potencial antioxidante.

Dessa forma, sabendo que a glutathiona reduzida (GSH) é uma das principais defesas antioxidantes endógenas e que é uma ferramenta utilizada para avaliar o balanço óxido-redutor no tecido, foi estudada sua atividade após a indução da LRA por I/R, bem como a ação do óleo essencial nesse contexto.

A figura 17 mostra os níveis de glutathiona reduzida nos grupos experimentais, onde foi observado aumento no acúmulo de GSH nos tecidos após o tratamento, indicando possível defesa antioxidante, mesmo quando a lesão não foi capaz de reduzir os níveis teciduais de GSH no grupo I/R. Os dados numéricos relacionados as determinações de MDA e GSH estão presentes na tabela 5.

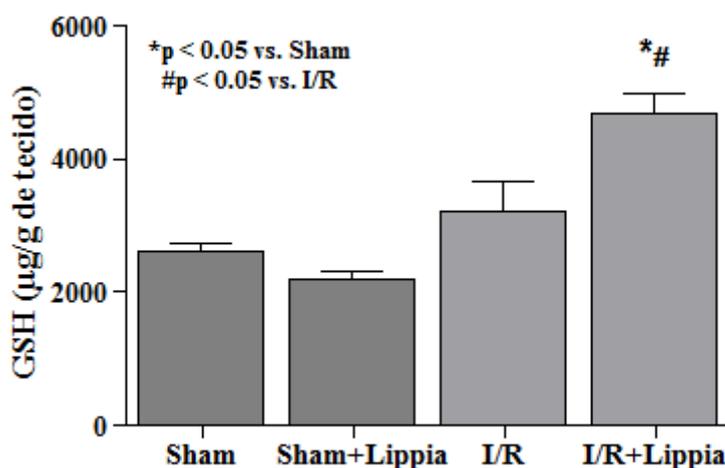
Figura 16: Níveis teciduais de MDA nos grupos experimentais.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=6 e os dados expressos como média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 17: Níveis teciduais de GSH nos grupos experimentais.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=6 e os dados expressos como média \pm EPM. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5: Determinações de MDA e GSH.

Grupos	MDA ($\mu\text{g/g}$ de tecido)	GSH ($\mu\text{g/g}$ de tecido)
Sham	153.5 \pm 21.4	2606 \pm 116.5
Sham+Lippia	167.4 \pm 11.5	2206 \pm 109.4
I/R	248.1 \pm 15.5	3225 \pm 439.9
I/R+Lippia	172.5 \pm 19.4	4680 \pm 310.3

Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, $p < 0,05$. I/R= isquemia/reperfusão; I/R+Lippia= isquemia/reperfusão+Lippia alba.

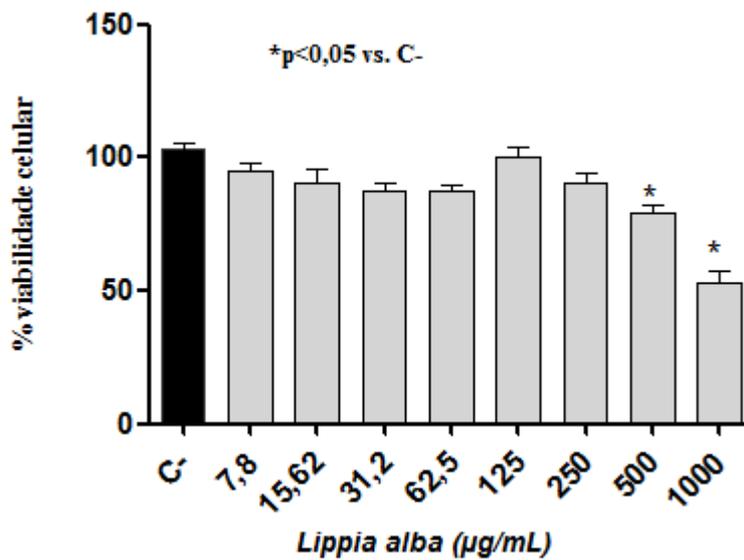
Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Estudos *in vitro*

5.3.1 Cultura de células renais e viabilidade celular.

Para a avaliação da viabilidade celular, foi realizado o ensaio de redução do MTT. Nesse ensaio, foi observado que apenas as maiores concentrações do óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II apresentaram toxicidade nas células LLC-MK2 (500 $\mu\text{g/ml}$ e 1000 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 18). Concomitantemente, não foram demonstrados efeitos tóxicos nas concentrações restantes. Observando-se a tabela 6, pode-se verificar que a porcentagem de viabilidade celular na linhagem estudada.

Figura 18: Percentual de viabilidade celular das células LLC-MK2 tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=3, e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Na análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, *p<0,05 vs. grupo controle (C-)

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 6: Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 tratadas com várias concentrações do óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II.

		<i>Lippia alba</i> ($\mu\text{g/ml}$)							
C-		7,8	15,62	31,25	62,5	125	250	500	1000
Viabilidade									
Celular (%)	103,6 \pm 2.2	94,98 \pm 2.8	90,18 \pm 5.7	87,63 \pm 3.1	87,59 \pm 2.4	100,3 \pm 3.8	90,53 \pm 3.7	79,51 \pm 3.0	52,98 \pm 4.4
LLC-MK2									

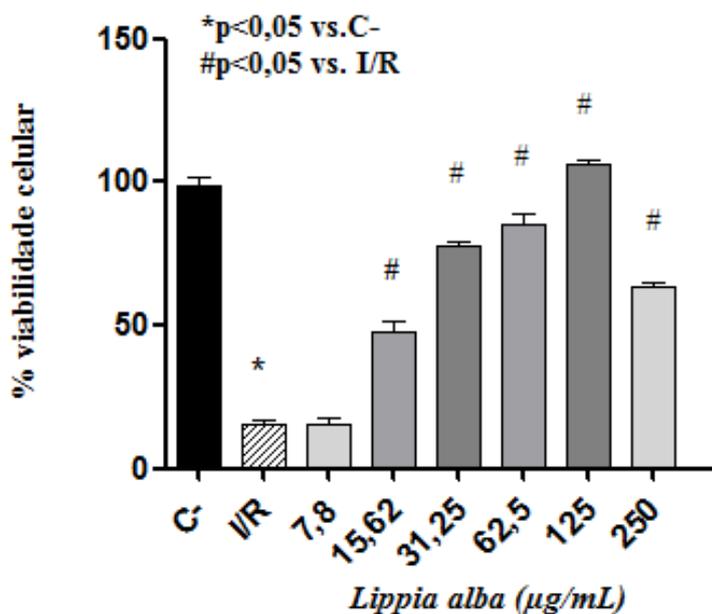
Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, onde C- (controle negativo) e I/R (isquemia/reperfusão).

Fonte: Dados da pesquisa.

Após a finalização do experimento de viabilidade, foram definidas as concentrações de trabalho para a aplicação do método de câmara de anaerobiose com objetivo de instalação da I/R *in vitro*. As células foram submetidas a condições que simulassem a isquemia e reperfusão e a seguir foram tratadas com o óleo essencial de *Lippia alba* afim de avaliar os possíveis efeitos protetores da substância pelo aumento do percentual de viabilidade celular.

Na figura 19, o controle negativo está relacionado a células submetidas a condições de aerobiose (37° C e 5% CO₂), ou seja, células com percentual de viabilidade total. No grupo I/R, temos a cultura de células submetidas a condições de anaerobiose sem o tratamento com óleo essencial de *Lippia alba*, que reduziu a viabilidade para aproximadamente 15%, conforme observado na tabela 7, por conseguinte foi observado o tratamento das células com o óleo nas diversas concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8 µg/ml). Foi observado um aumento do percentual da viabilidade nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5 e 125 µg/ml o que mostrou o efeito protetor do óleo essencial de *Lippia alba*, quando comparados ao grupo controle (Sham). Foi demonstrado ainda, que a concentração de 125 µg/ml apresentou reversão total do dano causado pela isquemia.

Figura 19: Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*.



Legenda: Os experimentos foram realizados com $n=3$, e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Na análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, $*p<0,05$ vs. grupo controle (C-); I/R (isquemia/reperfusão).

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 7: Percentual de viabilidade das células LLC-MK2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*.

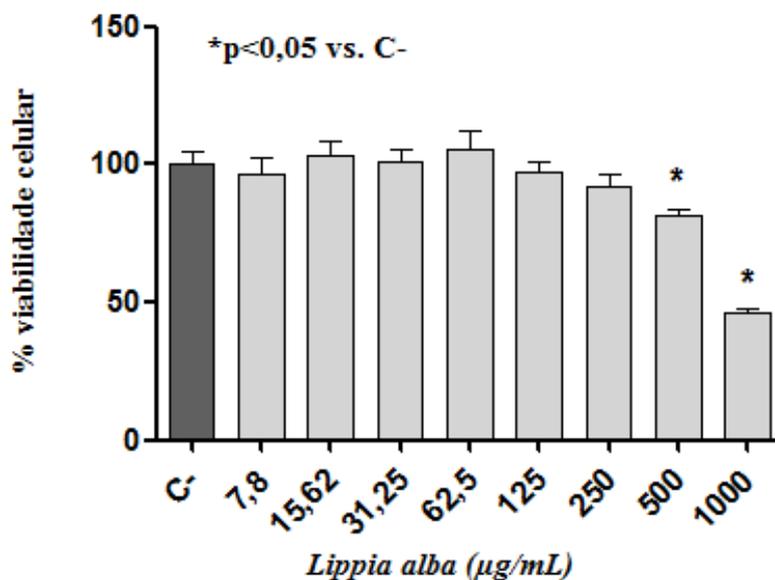
	<i>Lippia alba</i> ($\mu\text{g/ml}$)						
	C-	I/R	15,62	31,25	62,5	125	250
Viabilidade							
Celular (%)	111 \pm 3.1	15.2 \pm 4.0	50.1 \pm 4.8	50.3 \pm 3.7	50.3 \pm 3.6	98.3 \pm 2.5	42.1 \pm 3.5
LLC-MK2							

Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, onde C- (controle negativo) e I/R (isquemia/reperfusão).

Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 20, foi observado a viabilidade celular de células tubulares humanas, HK-2, tratadas com as mesmas concentrações do óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II utilizadas para as células LLC-MK2 (1000;500;250;125;62,5;31,25; 15,62;7,81 $\mu\text{g/ml}$). Foi demonstrado que, apenas, as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram toxicidade na linhagem de células HK-2, conforme se observou na tabela 8. Esses achados foram semelhantes aos encontrados com as células da linhagem LLC-MK2.

Figura 20: Percentual de viabilidade celular das células HK-2 tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=3, e os dados expressos como percentual de viabilidade \pm EPM. Na análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, *p<0,05 vs. grupo controle (C-)

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 8: Percentagem de viabilidade celular das células HK-2 tratadas com diversas concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*.

		<i>Lippia alba</i> (µg/ml)								
		C-	7,8	15,62	31,25	62,5	125	250	500	1000
Viabilidade										
Celular (%)		100,0±4,7	96,78±5,4	103,5±4,8	100,7±5,0	105,2±6,9	97,37±3,4	92,34±4,2	81,17±2,8	46,16±1,4
HK2										

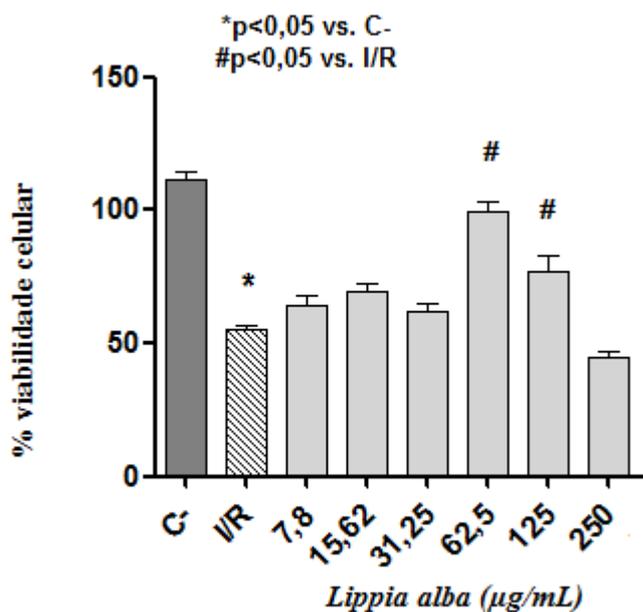
Legenda: Os dados estão expressos como média padrão ± EPM, onde C- (controle negativo) e I/R (isquemia/reperfusão).

Fonte: Dados da pesquisa.

Assim como, em células LLC-MK2, também foram realizados experimentos para estabelecimento de I/R *in vitro* em células HK-2. O protocolo realizado foi o mesmo citado anteriormente.

Na figura 21, o controle negativo (C-) está relacionado a células com percentual de viabilidade pleno, ou seja, que foram mantidas em condições de aerobiose (37° C e 5% CO₂). No grupo I/R, foi observada uma redução de viabilidade (45,2%) nas células HK-2 tratadas com o óleo essencial de *Lippia* em relação ao grupo controle negativo, conforme se observa na tabela 9. Após o tratamento com o óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II em variadas concentrações (1000;500;250;125;62,5; 31,25;15,62 e 7,8 µg/ml), foi observado o aumento do percentual de viabilidade na concentração de 62,5 e 125 µg/ml, quando comparados ao grupo controle (Sham), demonstrando, assim, citoproteção direta do óleo em relação as células estudadas.

Figura 21: Percentual de viabilidade das células HK-2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*.



Legenda: Os experimentos foram realizados com n=3, e os dados expressos como percentual de viabilidade ± EPM. Na análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, *p<0,05 vs. grupo controle (C-); I/R (isquemia/reperfusão).

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9: Percentual de viabilidade das células HK-2 submetidas ao modelo de I/R *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*.

		<i>Lippia alba</i> ($\mu\text{g/ml}$)						
		C-	I/R	15,62	31,25	62,5	125	250
Viabilidade								
Celular (%)		111 \pm 3.1	45.2 \pm 1.9	63.9 \pm 4.4	69.2 \pm 3.1	62.2 \pm 2.9	99.3 \pm 4.0	77.3 \pm 5.7
HK2								

Legenda: Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM, onde C- (controle negativo) e I/R (isquemia/reperfusão).

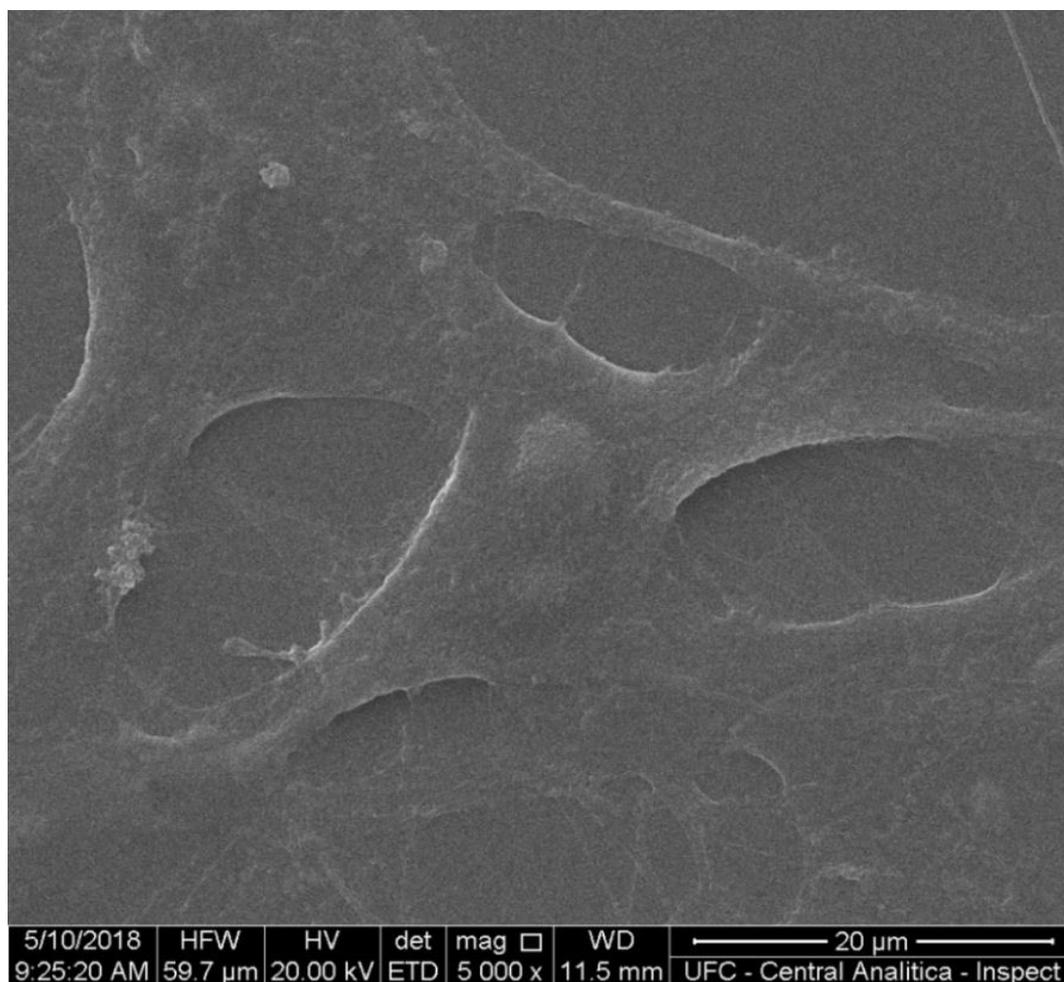
Fonte: Dados da pesquisa.

5.3.2 Avaliação de alterações morfológicas ultraestruturais

As análises por microscopia eletrônica de varredura demonstraram a atuação do óleo essencial de *Lippia alba* em células tubulares HK-2 isquemiadas, que apresentaram melhora significativa de sua morfologia, quando comparadas a células submetidas a anaerobiose, ou seja, submetidas, unicamente, ao processo de isquemia e reperfusão.

A figura 22 mostra células HK-2 submetidas a condições normais de aerobiose, onde se observa a morfologia intacta e preservada. As células submetidas ao processo de isquemia e reperfusão *in vitro* (Figura 23) apresentam em sua estrutura morfológica alterações, como redução de tamanho e volume, degeneração do material nucléico, formação de corpos apoptóticos, que caracterizam um processo indicativo de apoptose. Na figura 24, observa-se células tubulares submetidas ao processo de I/R *in vitro* e tratadas com a concentração de **62,5 $\mu\text{g/mL}$** do óleo essencial de *Lippia alba*, que foi escolhida por ser a menor concentração com atividade visualizada nos experimentos anteriores sendo observada, claramente, a preservação da estrutura celular das mesmas.

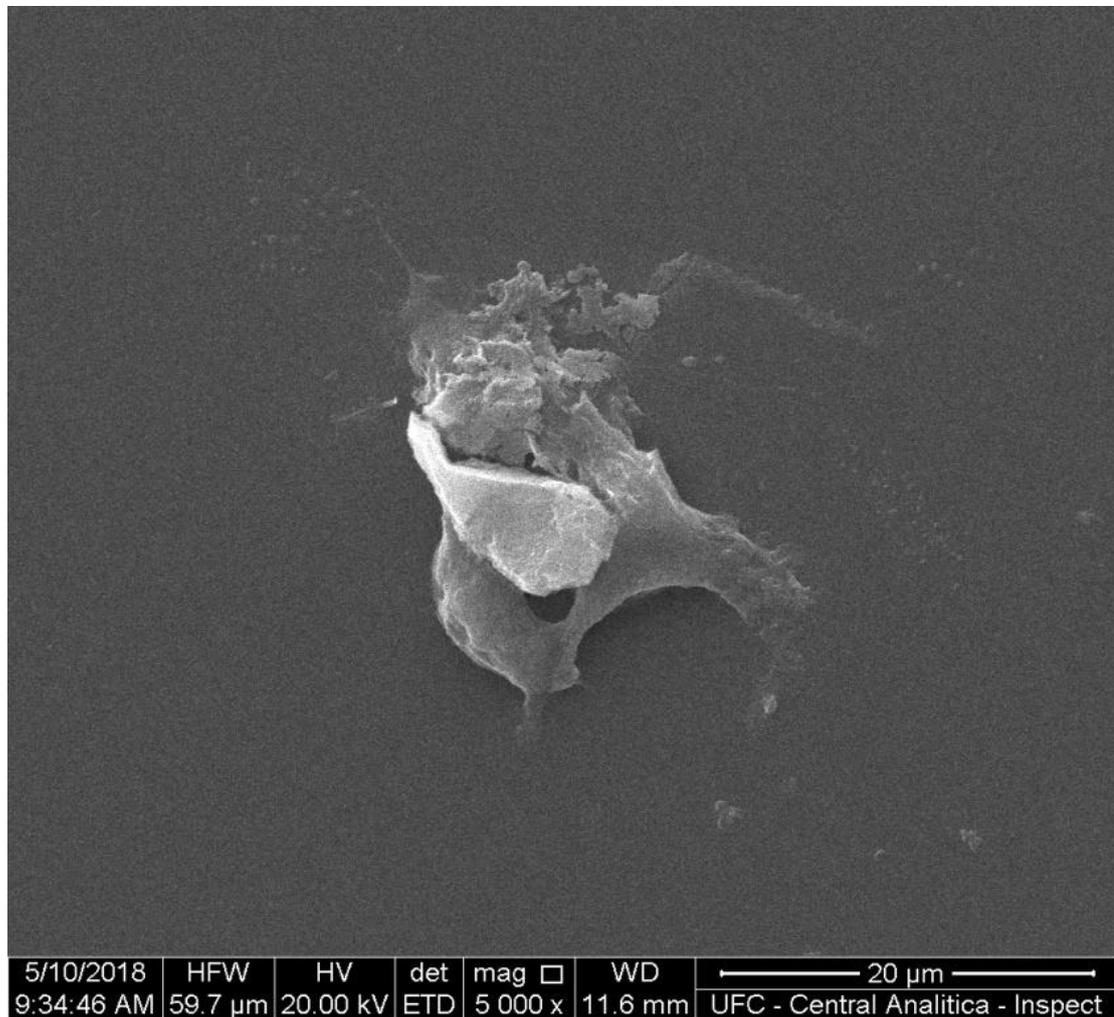
Figura 22: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células HK-2 em condições de aerobiose.



Legenda: Observam-se células HK-2 intactas morfológicamente. Barra de escala: 20 μ m.

Fonte: Dados da pesquisa.

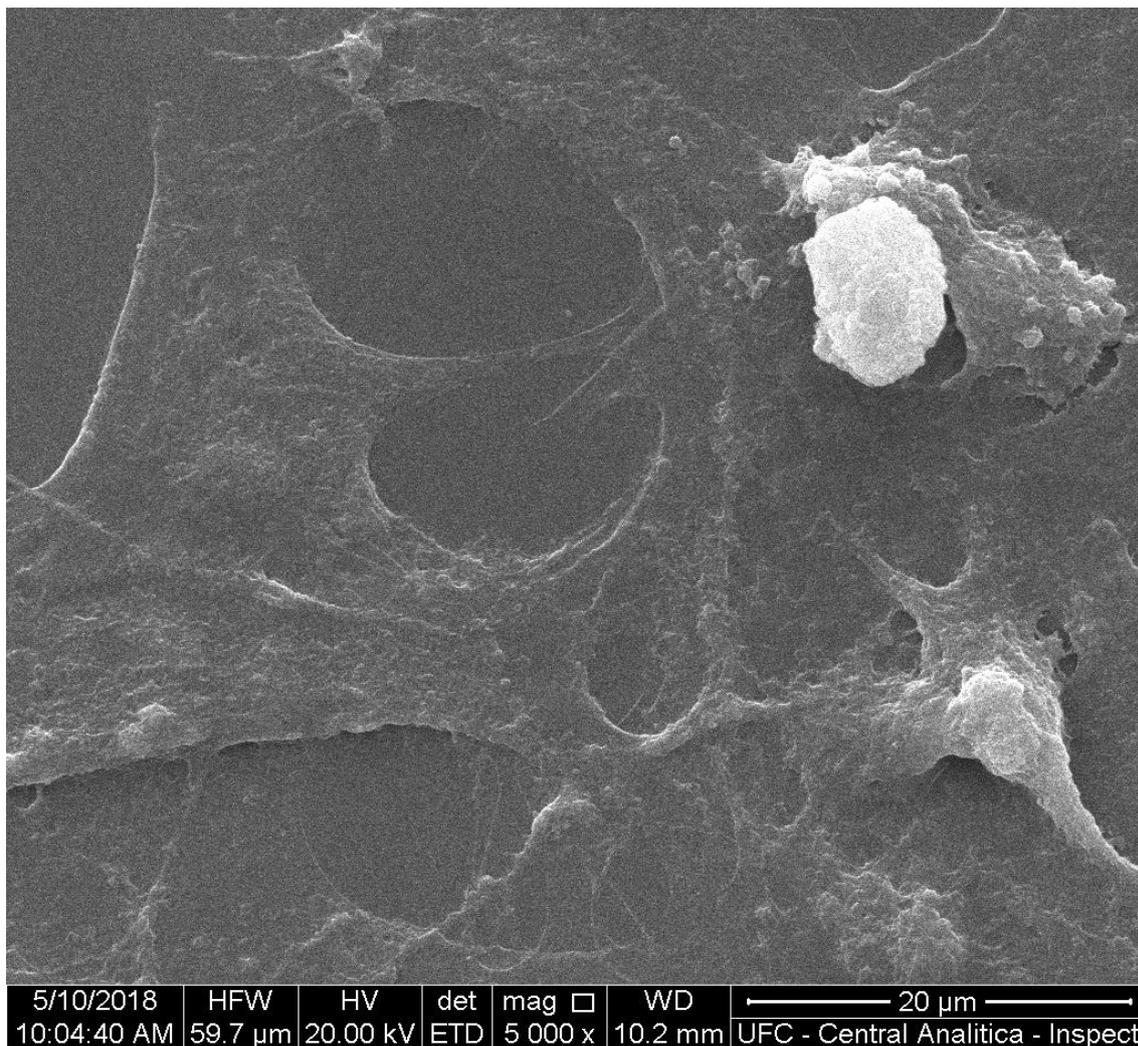
Figura 23: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células HK-2, submetidas ao processo de isquemia/reperfusão, não tratadas.



Legenda: Observam-se células HK-2 em processo indicativo de apoptose. Barra de escala: 20μm.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 24: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células HK-2, submetidas ao processo de isquemia/reperfusão, tratadas com o óleo essencial de *Lippia alba* (62,5 µg/mL).



Legenda: Observam-se células HK-2 isquemiadas com estruturas morfológicas preservadas após o tratamento com o óleo essencial de *Lippia alba* (62,5µg/mL). Barra de escala: 20µm.

Fonte: Dados da pesquisa.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O processo de isquemia ocorre quando o órgão alvo sofre diminuição ou ausência de fluxo sanguíneo, o que leva a redução dos níveis de oxigênio no tecido. Em seguida, quando esse fluxo é restaurado, caracteriza-se o mecanismo de reperfusão (HARRIS *et al.* 2015). A I/R é responsável, então pelo dano tecidual causado pelo excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse dano ocorre em diversos processos patológicos, como acidente vascular cerebral, traumas, lesão renal aguda (LRA) e outros (SHARFUDDIN; MOLITORIS, 2011).

A LRA tem como uma das suas principais causas a lesão por I/R. Tal mecanismo envolve danos celulares, como apoptose e inflamação. Não existem tratamentos específicos para esse processo, sendo os cuidados apenas profiláticos e sintomáticos, principalmente, em regiões de populações de baixo poder aquisitivo (KEMLIN *et al.*, 2018; SHARFUDDIN; MOLITORIS, 2011).

Uma fonte de substâncias de baixo custo e fácil acesso, que podem reverter ou melhorar a LRA provocada por I/R são os produtos naturais, devido as suas propriedades antioxidantes (SAMPAIO *et al.* 2016; TORRES-MARTÍNEZ *et al.* 2018). Dentre os produtos naturais, estudos com óleos essenciais de plantas têm se mostrados promissores, justamente por apresentarem atividades antioxidantes já pronunciadas (MAMADALIEVA *et al.*, 2018; MOSBAH *et al.*, 2018).

A erva-cidreira (*Lippia alba* quimiotipo II) possui em seu óleo essencial uma diversidade grande de componentes ativos, dentre os quais foram observados citral (cis-citral e trans-citral) e limoneno, como majoritários, conforme foi encontrado durante a realização da CG-CM, nesse estudo. Estudos mostram que o citral é um componente chave presente em óleos essenciais de plantas herbáceas, dentre elas a *Lippia alba*, e que tal molécula possui a atividades farmacológicas variadas, como antibacteriana e antiinflamatória, além de apresentar atividade antioxidante pronunciada em diversas linhagens celulares (SONG *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2013). O limoneno também demonstrou efeitos antimicrobianos e antioxidantes (CUTILLAS *et al.*, 2018). Assim, sabendo da importância e necessidade da descoberta de novas moléculas que auxiliem na prevenção ou redução da injúria renal e conhecendo as propriedades atribuídas aos componentes do óleo essencial de *Lippia alba*, foi investigado o efeito nefroprotetor do óleo em modelos (*in vivo e in vitro*) de lesão renal aguda por I/R.

O modelo experimental *in vivo* utilizado, nesse estudo, é comprovadamente confiável para o estabelecimento de dano renal por I/R. Sendo usado em estudos anteriores, que também envolviam o uso de produtos naturais como substâncias nefroprotetoras (DA COSTA *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016).

A fim de analisar os mecanismos fisiológicos e as alterações envolvidas no processo de lesão renal aguda foram realizadas as dosagens de parâmetros bioquímicos clássicos utilizando amostras de sangue e urina. Foi observado um aumento das concentrações plasmáticas de creatinina, ureia e ácido úrico no grupo submetido ao processo de I/R e foi visto, ainda, uma redução do clearance de creatinina. Quando se avaliou o grupo tratado, ou seja, que sofreu I/R e recebeu doses diárias do óleo essencial de *Lippia alba*, foi observada a proteção parcial das alterações funcionais causadas pelo processo de injúria.

Tradicionalmente, sabe-se que a redução da função renal se manifesta através do acúmulo de metabólitos nitrogenados, como ureia e creatinina. A creatinina é um produto residual da creatina fosfato nos músculos, e geralmente é produzida em uma taxa constante no organismo. Uma fração constante diária de creatina (1%) e de fosfocreatina (2%) é convertida por um processo não enzimático em creatinina. Também pode haver a conversão enzimática de fosfocreatina em creatinina pela ação da creatinoquinase (cerca de 20 a 25%). A determinação laboratorial da ureia plasmática é responsável pela avaliação da função renal, principalmente, a nível tubular. A uréia é sintetizada no fígado a partir da amônia derivada do catabolismo dos aminoácidos, sendo excretada principalmente na urina. Tal composto é filtrado no glomérulo e parcialmente reabsorvido nos túbulos renais (HORN *et al.* 1998; SODRÉ, 2007). Estudos mostram que mesmo o comprometimento da atividade renal sendo leve, creatinina e uréia plasmática sofrem alterações significativas, sendo esses parâmetros preditores de conseqüências clínicas relacionadas à LRA (ANDRADE *et al.*, 2018).

O ácido úrico, juntamente com uréia e creatinina, é um parâmetro bioquímico utilizado como indicador de dano renal em vários estudos recentes, visto que é diretamente secretado pelos túbulos proximais. O aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico está intimamente ligado a danos tubulares na lesão pré renal e, principalmente, na necrose tubular aguda (NTA) (DA COSTA *et al.*, 2003; HAMED *et al.*, 2018).

Nesse estudo, observaram-se alterações dos níveis de creatinina, ureia e ácido úrico plasmático, sugerindo, assim, que o processo de isquemia/reperfusão provocou dano tubular renal nos animais do grupo submetido à cirurgia para instalação de LRA. Estudos anteriores mostram que o dano por isquemia causa uma série de eventos fisiológicos, causando alterações nas células tubulares, principalmente, da região proximal, que se tornam incapazes de manter o ATP celular, levando a morte celular por apoptose ou necrose (ANDRADE *et al.*, 2018; SHARFUDDIN; MOLITORIS, 2011). Assim, foi observado que o óleo essencial de *Lippia alba* recuperou os níveis plasmáticos de creatina, uréia e ácido úrico no grupo I/R tratado, o que sugere que seu mecanismo de ação deve estar ligado a efeitos a nível de túbulos renais.

A LRA cursa com uma queda acentuada da taxa de filtração glomerular (TFG) com conseqüente deterioração da função renal. Na prática clínica, o *clearance* de creatinina em urina de 24 horas, que diretamente proporcional a medida da creatinina urinária e inversamente proporcional a de creatinina plasmática, ainda é utilizado para determinação da TFG (ANDRADE *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram o uso da medição da depuração de creatinina associada à dosagem de potássio sérico para avaliação do dano renal (BURNS; HO, 2018).

O presente estudo mostrou que o tratamento com o óleo essencial de *Lippia alba* reverteu a diminuição do *clearance* de creatinina, observada no grupo lesão (I/R), sugerindo possíveis efeitos do óleo sobre o glomérulo renal, visto que apresenta influência diante da TFG.

Estudos prévios mostram que a taxa de filtração glomerular (TFG) e a medição dos níveis de proteínas na urina, principalmente de albumina, são parâmetros importantes no diagnóstico de LRA e da doença renal crônica (RADIŠIĆ BILJAK *et al.*, 2017). A albumina é a mais abundante proteína de alto peso molecular (~66kDa) presente no plasma e é excretada na urina de forma contínua. Porém, devido seu tamanho, a mesma não deve ser filtrada. Quando a excreção de albumina é maior que 30mg/dia indica o processo de albuminúria, que reflete uma alteração na barreira de filtração glomerular, sendo assim, níveis altos de albumina na urina podem indicar danos renais a nível de glomérulo (LEVEY *et al.*, 2015; VART *et al.*, 2016).

Nesse trabalho, foi observado que os níveis de albumina excretados na urina do grupo que sofreu lesão por I/R se elevaram, quando comparados ao grupo Sham. Porém, o óleo essencial de *Lippia alba* não foi capaz de reduzir significativamente esse

parâmetro. Além disso, quando se analisa a proteinúria de 24 horas nota-se que não houve significância entre os grupos estudados.

Conhecendo o fato de que o processo de isquemia é responsável por causar lesão tecidual, devido ausência de oxigênio e que a reperfusão, que nada mais é que a reoxigenação do tecido, gera a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por exacerbar a lesão isquêmica aguda, foi decidido estudar a ação do óleo essencial de *Lippia alba* sobre parâmetros que avaliam o equilíbrio óxido-redutor no tecido, visto que o óleo possui componentes majoritários que já apresentam efeitos farmacológicos antioxidantes previamente descritos (SHIMO *et al.* 2011; XIA *et al.* 2013; HARRIS *et al.* 2015; EHSANI *et al.* 2017).

A determinação de níveis de GSH se baseia na reação entre duas moléculas de GSH, que doam um elétron cada uma para a glutatona oxidada (GSSG), que pode ser reduzido novamente ao GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR). O desequilíbrio redox é evidenciado pela baixa proporção das concentrações das moléculas de GSH e GSSG (GSH/GSSG) (GIUSTARINI *et al.*, 2013). O MDA representa as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que são formadas através da peroxidação lipídica, essa reação acontece devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HARDWICK *et al.*, 2010). Estudos anteriores mostram a utilização das determinações de MDA e GSH para avaliação do equilíbrio redox após o tratamento com substâncias naturais antioxidantes, como (-)- α -bisabolol e própolis vermelha, que foram capazes de promover melhoria da lesão renal aguda por I/R, sugerindo, assim, o envolvimento de mecanismos oxidativos na injúria renal (DA COSTA *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016)

Assim, no presente estudo, o estresse oxidativo no tecido renal foi avaliado através da medição do malondialdeído (MDA) e da glutatona reduzida (GSH). Foi visto que houve um aumento significativo na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), representadas pelo MDA, e uma discreta redução de GSH tecidual no grupo onde foi estabelecida a LRA por I/R. O grupo tratado com o óleo essencial de *Lippia alba* apresentou uma tendência a redução das TBARS e teve GSH aumentada significativamente, quando comparado ao Sham e ao grupo lesão (I/R).

Na tentativa de investigar efeitos do óleo essencial de maneira mais direta foi realizado o ensaio de cultivo celular, em duas linhagens de células tubulares renais imortalizadas LLC-MK2 (macaco) e HK-2 (humanas), e observou-se que o óleo essencial de *Lippia alba* quimiotipo II não apresentou toxicidade nas concentrações

estudadas, exceto nas concentrações de 500 µg/ml e 1000 µg/ml. No processo de I/R *in vitro*, as células, quando comparadas ao grupo controle aerobiose, apresentaram redução significativa de percentual de viabilidade, demonstrando, assim, que foi estabelecida a lesão por isquemia e reperfusão. Contudo, ao serem tratadas com concentrações pré estabelecidas do óleo essencial de *Lippia alba*, as células das duas linhagens tiveram reversão parcial dos danos celulares causados por I/R, com aumento do percentual de viabilidade. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que o rim possui alto potencial regenerativo e pode se recuperar completamente após o estabelecimento de uma lesão renal aguda (LRA), visto que a primeira fase do reparo após a lesão é caracterizada pela grande proliferação de células epiteliais nos túbulos renais, principalmente, o túbulo proximal (KRAMANN; KUSABA; HUMPHREYS, 2015).

A fim de demonstrar a morfologia das células, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) já foi utilizada, anteriormente, como componente em estudos envolvendo células renais (NASCIMENTO *et al.* 2017). No presente trabalho, utilizamos a MEV para observação das alterações morfológicas das células HK-2 após o processo de isquemia e reperfusão (I/R) realizado pelo protocolo descrito anteriormente. Observou-se, assim, que as células renais submetidas a I/R apresentaram sinais indicativos de apoptose. A apoptose é um mecanismo de morte celular lento, onde a célula sofre alterações morfológicas marcantes, como a perda do contato com sua matriz extracelular e células vizinhas, o que caracteriza redução de tamanho e volume celular. Além disso, haverá formação de blebbing (borbulhamento), desintegração nuclear em fragmentos característicos (cariorrhexis) e formação de corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; VANDEN BERGHE *et al.*, 2013).

Avaliando as células HK-2 submetidas a I/R e tratadas com o óleo essencial de *Lippia alba* na concentração de 62,5 µg/mL foi observado que o tratamento com o óleo reverteu a lesão por I/R. O processo de isquemia e reperfusão leva a formação de espécies reativas de oxigênio, que causam dano celular por estresse oxidativo (YAHYAPOUR *et al.*, 2018). A utilização do óleo essencial de *Lippia alba*, rico em moléculas com atividade antioxidante comprovadas, como o citral, no tratamento das células isquemiadas, pode ter sido a responsável pela reversão da lesão observada. Estudos anteriores mostraram o efeito protetor do citral em diversas linhagens celulares, bem como a atividade antioxidante de óleos essenciais que possuíam citral em sua composição (BOUZENNA *et al.*, 2017; EHSANI *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Lippia alba* (erva-cidreira) destaca-se como um produto com atividade nefroprotetora, visto que, pode estar envolvida em mecanismos antioxidantes, devido a sua composição e sabe-se que a lesão renal aguda (LRA) está intimamente ligada a produção de radicais livres.

Sugere-se, também, a atividade do óleo na redução da lesão renal, o que foi observado através da redução de parâmetros bioquímicos, como creatinina, uréia e ácido úrico. Além disso, foi observado envolvimento da ação do óleo na taxa de filtração glomerular, o que é mostrado pela capacidade de aumentar o clearance de creatinina.

O óleo essencial mostrou-se capaz de aumentar a viabilidade celular em células tubulares (LLC-MK2 e HK2), quando comparado ao grupo controle, além de reverter a lesão em células HK-2, como visto através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Portanto, pode-se inferir a atividade nefroprotetora do óleo essencial de *Lippia alba* e ressalta-se a facilidade de obtenção do produto, visto que, a mesma se apresenta na natureza.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835–10847, 2013.
- ANDRADE, L. *et al.* Acute Kidney Injury as a Condition of Renal Senescence. p. 1–15, 2018.
- ARRUDA, D. C. *et al.* Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 63, n. 9, p. 643–649, 2009.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARRETO, R. S.S. *et al.* A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 846–862, 2014.
- BASCHIERI, A. *et al.* Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. [S.l: s.n.], 2017. v. 232.
- BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **The Lancet**, v. 380, n. 9843, p. 756–766, 2012.
- BLANCO, M. A. *et al.* Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 803–809, 2013.
- BOUZENNA, H. *et al.* Biological properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 653–660, 2017.
- BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010..
- BU, X. *et al.* Evaluation of a compact mass spectrometer for routine support of pharmaceutical chemistry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, p. 139–144, 2014.
- BURNS, A. R; HO, K. M. Urinary potassium excretion and its association with acute kidney injury in the intensive care unit. **Journal of Critical Care**, v. 46, p. 58–62, 2018.
- CUTILLAS, A. B. *et al.* Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 529–544, 2018.
- DA COSTA, M. F. B. *et al.* Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 22, n. 9, p. 787–795, 2015.

- DANGKONG, D.; LIMPANASITHIKUL, W.. Effect of citral on the cytotoxicity of doxorubicin in human B-lymphoma cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 262–268, 2015.
- DE SOUZA, R. C. *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. September, p. 29–33, 2017.
- EHSANI, A. *et al.* Phytochemical , antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils. v. 8, n. 3, p. 223–229, 2017.
- ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T.. Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1391–1401, 2011.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.
- FURLAN, M. R. *et al.* Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC) Staf, Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 686–691, 2010.
- GIUSTARINI, D. *et al.* Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. **Nature Protocols**, v. 8, n. 9, p. 1660–1669, 2013.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- HAMED, H. *et al.* Fermented camel milk prevents carbon tetrachloride induced acute injury in kidney of mice. n. May, 2018.
- HARDWICK, R. N *et al.* Differences in Antioxidant Response Enzymes in Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 38, n. 12, p. 2293–2301, 2010.
- HARRIS, D.G.*et al.* Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. **J Crit Care**. v. 30, n.1, p. 102-6, 2015.
- HENNEBELLE, T. *et al.* Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211–222, 2008.
- HOTCHKISS, R. S *et al.* Cell death in disease: mechanisms and emerging therapeutic concepts. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 16, p. 1570–1583, 2009.
- HU, J. *et al.* Sialic acid-modified solid lipid nanoparticles as vascular endothelium-targeting carriers for ischemia-reperfusion-induced acute renal injury. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1856–1867, 2017.
- DA COSTA J.A.C *et al.* Insuficiência renal aguda. **Revista da Faculdade de Medicina**

de Ribeirão Preto, v. 36, p. 307–324, 2003.

JÚNIOR, L. R. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112–119, 2001.

KAM TAO LI, P; BURDMANN, E A; MEHTA, R L. Acute kidney injury: Global health alert. **Journal of nephropathology**, v. 2, n. 2, p. 90–97, 2013.

KANAGASUNDARAM, N. S. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 193–205, 2015.

KELLUM, J.A. Acute kidney injury. **Crit Care**. v. 36, p 141-5.2, 2008.

KEMLIN, D. *et al.* Acute kidney injury in critically ill patients with solid tumours. n. March, p. 1–8, 2018.

KRAMANN, R.; KUSABA, T.; HUMPHREYS, B. D. Who regenerates the kidney tubule? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 6, p. 903–910, 2015.

LEVEY, A. S.; BECKER, C.; INKER, L. A. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: A systematic review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 8, p. 837–846, 2015.

MAMADALIEVA, N.Z. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of three Uzbek Lamiaceae species. **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–4, 2018.

MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: Uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 382–387, 2007.

MELLO, C. P. *et al.* Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon**, v. 130, p. 56–62, maio 2017.

MENEZES, I. A.C. *et al.* Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 65 C, n. 9–10, p. 562–566, 2010.

MOSBAH, H. *et al.* *Rhaponticum acaule* (L) DC essential oil : chemical composition , in vitro antioxidant and enzyme inhibition properties. p. 1–12, 2018.

MURUGAN, R. NIH Public Access. **Nat Rev Nephrol** . 2011 April ; 7(4): 209–217. doi:10.1038/nrneph.2011.13., v. 7, n. 4, p. 209–217, 2011.

NIEDERBACHER, B.; WINKLER, J. B.; SCHNITZLER, J. P. Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 18, p. 5403–5416, 2015.

NUNES, T.F.; BRUNETTA, D.M.; LEAL, C.M.; PISI, P.C.; RORIZ, J.S.; Insuficiência Renal Aguda. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 43(3): 272-82, 2010.

OZ, M. *et al.* Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 152, p. 83–97, 2015.

RADIŠIĆ BILJAK, V. *et al.* The role of laboratory testing in detection and classification of chronic kidney disease: National recommendations. *Biochemia Medica*, v. 27, n. 1, p. 153–176, 2017.

SAMPAIO, T. L. *et al.* Nephroprotective effects of (–)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*, v. 23, n. 14, p. 1843–1852, 2016.

SCHNERMANN, M. J.; SHENVI, R. A. Syntheses and biological studies of marine terpenoids derived from inorganic cyanide. *Natural Product Reports*, v. 32, n. 4, p. 543–577, 2015.

SHARFUDDIN, A. A.; MOLITORIS, B. A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*, v. 7, n. 4, p. 189–200, 2011.

SILVA, F. A.M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.

SHIMO, T.; MOTO, M.; ASHIZAWA, N.; OBA, K.; NAGATA, O. Study on toxicological aspects of crystal-mediated nephrotoxicity induced by FYX-051, a xanthine oxidoreductase inhibitor, in rats. *Drug Chem Toxicol.* v. 34, n.2, p 192-8, 2011.

SONG, Y. *et al.* Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Inflammation*, v. 39, n. 2, p. 663–671, 2016.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. D. Lippia alba: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, v. 4, n. 1, p. 204–220, 2011.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 7, p. 1231–1249, 2014.

TONI, C. *et al.* Sedative effect of 2-phenoxyethanol and essential oil of Lippia alba on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Research in Veterinary Science*, v. 103, p. 20–27, 2015.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, v. 86, n. 1, p. 271–278, 1978.

VALE, T. G. *et al.* Behavioral effects of essential oils from Lippia alba (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, n. 2, p. 127–133, 1999.

VANDEN BERGHE, T. *et al.* Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117–129, 2013.

VART, P.; GRAMS, M. E. Measuring and Assessing Kidney Function. **Seminars in Nephrology**, v. 36, n. 4, p. 262–272, 2016.

XIA, H. *et al.* The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. **Cytotechnology**, v. 65, n. 1, p. 49–57, 2013.

YAHYAPOUR, R. *et al.* Reduction–oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics. **Clinical and Translational Oncology**, n. 0123456789, 2018.

YANG, S.M *et al.* Citral Is Renoprotective for Focal Segmental Glomerulosclerosis by Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis and Activating Nrf2 Pathway in Mice. **Plos One**. v.8, 2013.

YU L.; SANTOS, B.F.C.; SUASSUNA, J.H.R.; BATISTA P.B.P.; Diretrizes da AMB Sociedade Brasileira de Nefrologia – Insuficiência Renal Aguda. 2007.