

Methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves reduced serum creatinine level and prevented the elevation of hepatic enzymes in mice exposed to gentamicin and acetaminophen: an exploratory study

O extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* reduziu o nível de creatinina sérica e impediu a elevação das enzimas hepáticas em ratinho expostos a gentamicina e acetaminofeno: um estudo exploratório

Sebastián Funes-Rivera^{1,2} , María L. Kennedy¹ , Antonia K. Galeano¹ , Patricia M. Funes Torres² , Miguel A. Campuzano-Bublitz¹  

Keywords: *Bauhinia forficata*, silymarin, creatinine, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*, silimarina, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina

To Cite:

Funes-Rivera, S. F., Kennedy, M. L., Galeano, A. K., Funes Torres, P. M. & Campuzano-Bublitz, M. A. (2023) Methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves reduced serum creatinine level and prevented the elevation of hepatic enzymes in mice exposed to gentamicin and acetaminophen: an exploratory study. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 64-82.

 [10.19277/bbr.20.1.311](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.311)

1 - Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169. San Lorenzo. Paraguay

2 - Departamento de Bioquímica Clínica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Campus UNA, 2169. San Lorenzo. Paraguay

Correspondence to / Correspondência a: mbublitz@qui.una.py

Received / Recebido: 17/04/2023
Accepted / Aceite: 22/06/2023

Abstract

Kidney and liver diseases are a public health problem worldwide. Pharmacological management usually prevents its progress even if indirectly. Currently, more alternative treatments based on traditional medicine and medicinal plants are considered. *Bauhinia forficata* is widely distributed in South America and is used for its hepatoprotective and nephroprotective properties. This study was designed to preliminarily assess the nephroprotective and hepatoprotective effect of the methanol extract of *B. forficata* leaves (50, 100, 200, and 400 mg/kg, per os) in Swiss albino mice. Acute kidney injury was induced with gentamicin (135 mg/kg, intraperitoneal), followed by determination of creatinine, urea, uric acid, and electrolyte levels in urine and serum. Acute liver damage was induced by acetaminophen (300 mg/kg, intraperitoneal), followed by determination of a serum liver profile of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase. All tested doses of the extract were able to induce a significant reduction in serum creatinine levels, compared to untreated animals. Moreover, the extract effectively prevented the elevation of hepatic enzyme activity induced by acetaminophen. It is concluded that the extract of *B. forficata* leaves has nephroprotective and hepatoprotective effects in a mouse model of hepato and nephrotoxicity, which is compatible with traditional use.

Resumo

As doenças renais e hepáticas são um problema global de saúde pública. A gestão farmacológica impede geralmente a sua progressão. Atualmente, são desenvolvidos tratamentos alternativos baseados na medicina tradicional e na utilização de plantas medicinais. A *Bauhinia forficata* está amplamente distribuída na América do Sul e é utilizada pelas suas propriedades hepatoprotectoras e nefroprotectoras. Este estudo foi concebido para avaliar preliminarmente estes efeitos das folhas de *B. forficata* (50, 100, 200 e 400 mg/kg, per os) em ratinhos. A lesão renal aguda foi induzida com gentamicina (135mg/kg, intraperitoneal), seguida da determinação dos níveis de creatinina, ureia, ácido úrico e electrólitos na urina e no soro. A lesão hepática aguda foi induzida por acetaminofeno (300 mg/kg, intraperitoneal), seguida da determinação de um perfil hepático sérico de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Todas as doses testadas induziram uma redução significativa dos níveis séricos de creatinina, em comparação com os animais não tratados. Além disso, o extrato impediu eficazmente a elevação da atividade das enzimas hepáticas induzida pela acetaminofeno. Conclui-se que o extrato das folhas de *B. forficata* tem efeitos nefroprotectores e hepatoprotectores num modelo de ratinho de hepato e nefrotoxicidade, o que é compatível com a utilização tradicional.

Introduction

The kidneys and liver are organs closely related to substance metabolism and detoxification. Stress situations, such as metabolic overload or frequent exposure to harmful agents, particularly the action of xenobiotics, compromise their proper function (1, 2). Few therapeutic resources are available, so the study of alternative medications to preserve the functionality of these organs is very important (3).

The etiology of kidney disease is variable; some are specific to the individual according to physiological factors; others are related to underlying pathologies, such as diabetes or high blood pressure, or are due to direct factors such as nephrotoxic compounds. Among these, the main compounds are aminoglycoside antibiotics (2). Kidney disease is among the first ten leading causes of death worldwide, regardless of race, sex, age, or geographical location. In our country, Paraguay, a total of 366 patients required hemodialysis in 2010. In 2019, the total number of dialyzed patients increased to 1638, of which 61% were men (4). Worldwide, 5 million people die annually from lack of access to critical treatments for kidney disease. It is projected that chronic kidney disease will soon be the fifth leading cause of death. Generally, with limited epidemiological data, limited knowledge, and poor access to laboratory services, the true burden of kidney disease is underestimated. Kidney diseases are pathologically diverse and are often asymptomatic. As such, it is often diagnosed late, and patient care requires specialized resources that increase healthcare costs. Prevention of kidney disease is highly cost-effective but requires a multisectoral holistic approach (5).

The liver is a critical organ in the human body, responsible for various functions, such as bile secretion. It is also related to the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins, the processing of drugs and hormones, and the detoxification of substances such as alcohol, drugs and hormones through a process called biotransformation (6). Liver disease is multifactorial, and may be the result of metabolic imbalances, such as alpha-1-antitrypsin

Introdução

Os rins e o fígado são órgãos intimamente relacionados com o metabolismo e a desintoxicação das substâncias. Situações de stress, como a sobrecarga metabólica ou a exposição frequente a agentes nocivos, nomeadamente a ação de xenobióticos, comprometem o seu bom funcionamento (1, 2). Os recursos terapêuticos disponíveis são escassos, pelo que é muito importante o estudo de medicamentos alternativos destinados a preservar a funcionalidade destes órgãos (3).

A etiologia da doença renal é variável. Algumas são específicas do indivíduo, de acordo com factores fisiológicos, outras estão relacionadas com patologias subjacentes, como a diabetes ou a hipertensão arterial, ou devem-se a factores directos, como compostos nefrotóxicos como é o caso dos antibióticos aminoglicosídeos (2). A doença renal está já entre as dez primeiras causas de morte em todo o mundo, independentemente da raça, sexo, idade ou localização geográfica. No nosso País, o Paraguai, um total de 366 pacientes necessitaram de hemodiálise em 2010. Em 2019, o número total de pacientes dialisados aumentou para 1638, dos quais 61% eram homens (4). Em todo o mundo, 5 milhões de pessoas morrem anualmente devido à falta de acesso a tratamentos críticos para a doença renal (4). Prevê-se que a doença renal crónica venha em breve a ser a quinta principal causa de morte. Geralmente, com dados epidemiológicos limitados, conhecimentos reduzidos e acesso deficiente a serviços laboratoriais, o verdadeiro ónus da doença renal é subestimado. As doenças renais são patologicamente diversas e são frequentemente assintomáticas. Como tal, são frequentemente diagnosticadas tardiamente e os cuidados prestados aos doentes exigem recursos especializados que aumentam os custos dos cuidados de saúde. A prevenção da doença renal é altamente rentável, mas exige uma abordagem holística multissetorial (5).

O fígado é um órgão crítico do corpo humano, responsável por várias funções, como a secreção de bÍlis. Está também relacionado com o metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, com o processamento de fármacos e hormonas e com a desintoxicação de substâncias como o álcool, fármacos e hormonas através de um processo denominado biotransformação (6). A doença hepática é multifatorial, podendo resultar de desequilíbrios metabólicos, como a deficiência de alfa-1-antitripsina, hemocromatose (doença de

deficiency, hemochromatosis (Wilson's disease), obesity, accumulation of drugs such as paracetamol or other xenobiotics in the body, or due to viruses. Thus, it is a disease that can occur in individuals of all ages. One of the main chronic liver diseases worldwide is cirrhosis, derived from obesity or long-term abuse of alcoholic beverages, which mainly affects individuals between 60 and 80 years of age (7). Liver disease accounts for over 2 million deaths annually (cirrhosis, viral hepatitis, and liver cancer), 4% of all deaths. Currently, liver disease is the 11th leading cause of death, but liver deaths may be underestimated (7).

Current pharmacological treatments mainly treat these conditions indirectly, reducing the factors that can lead to more significant complications, with certain side effects and high costs. Silymarin is a mixture of flavonolignans extracted from the seeds of *Silybum marianum* used since ancient times to treat chronic and acute liver conditions. It has been shown to prevent liver damage caused by various toxins, with its effects frequently attributed to its antioxidant, free radical scavenging, and iron chelating properties (8).

Several plants have shown their nephroprotective properties in experimental studies in animal models, among them *Phyllanthus amarus* (9), green tea (10), and *Eclipta alba* (11). Likewise, the aqueous extract of the bark of *Bauhinia variegata* demonstrated protective effects against liver failure and nephrotoxicity caused by thioacetamide in rats (12) and those with liver damage caused by carbon tetrachloride (13). *Smallanthus sonchifolius* reversed acetaminophen-induced liver damage in rats (14) and *Opuntia ficus-indica* cladodes extract prevented lithium-induced liver injury (15). In previous works, we have demonstrated the hepato- and nephroprotective property of *Prosopis ruscifolia* (16), *Baccharis crispa* (17), and *Dorstenia brasiliensis* (18) in mice.

Bauhinia forficata (Fabaceae) is an arboreal species whose leaves are used in infusion to treat kidney and liver conditions and as a hypoglycemic agent. In Brazil, it is used as a hypolipidemic, diuretic, expectorant, tonic, carminative, and digestive, among other uses (19). It is also used topically as an astringent to treat wounds or canker sores.

Wilson), obesidade, acumulação de fármacos como o paracetamol ou outros xenobióticos no organismo, ou devido a vírus. Assim, é uma doença que pode ocorrer em indivíduos de todas as idades. Uma das principais doenças crônicas do fígado a nível mundial é a cirrose, resultando da obesidade ou do abuso prolongado de bebidas alcoólicas, que afecta principalmente indivíduos entre os 60 e os 80 anos de idade (7). As doenças hepáticas são responsáveis por mais de 2 milhões de mortes (cirrose, hepatite viral e cancro do fígado), ou seja, 4% de todas as mortes. Atualmente, a doença hepática é a 11.^a principal causa de morte, mas as mortes por doença hepática podem estar subestimadas (7).

Os tratamentos farmacológicos actuais tratam principalmente estas condições de forma indireta, reduzindo os factores que podem levar a complicações mais significativas, com determinados efeitos secundários e custos elevados. A silimarina é uma mistura de flavonolignanós extraída das sementes de *Silybum marianum* utilizada desde a antiguidade para tratar afecções hepáticas crónicas e agudas. Foi demonstrado que previne as lesões hepáticas causadas por várias toxinas, sendo os seus efeitos frequentemente atribuídos às suas propriedades antioxidantes, de eliminação de radicais livres e de quelação do ferro (8).

Várias plantas demonstraram as suas propriedades nefroprotectoras em estudos experimentais em modelos animais, entre elas o *Phyllanthus amarus* (9), o chá verde (10) e a *Eclipta alba* (11). Da mesma forma, o extrato aquoso da casca de *Bauhinia variegata* demonstrou efeitos protectores contra a insuficiência hepática e a nefrotoxicidade causada pela tioacetamida em ratinhos (12) e em ratinhos com lesões hepáticas causadas pelo tetracloreto de carbono (13). A *Smallanthus sonchifolius* inverteu as lesões hepáticas induzidas pelo acetaminofeno em ratinhos (14) e o extrato de cladódios de *Opuntia ficus-indica* preveniu as lesões hepáticas induzidas pelo lítio (15). Em trabalhos anteriores, demonstrámos as propriedades hepato- e nefroprotectora da *Prosopis ruscifolia* (16), *Baccharis crispa* (17), e *Dorstenia brasiliensis* (18) em ratinhos.

A *Bauhinia forficata* (Fabaceae) é uma espécie arbórea cujas folhas são utilizadas em infusão para tratar afecções renais e hepáticas e como agente hipoglicémico. No Brasil, é utilizada como hipolipidémico, diurético, expetorante, tónico, carminativo e digestivo, entre outros usos (19). Também é usado topicamente como adstringente para tratar feridas ou aftas.

The methanol extract of *B. forficata* showed good antioxidant and hypoglycemic activities (19). Based on its terpenoid composition, its antibacterial and fungicidal activity has been verified. The traditional medicinal use of the infusion of *B. forficata* leaves has not reported cases of toxic adverse effects (19), although *in vitro* studies have shown that depending on the dose, mitochondrial damage, as well as mutagenic activities and thyroid dysfunction, can occur (20, 21).

The main constituents of *B. forficata* in leaves are phenolic compounds, particularly flavonoids, together with terpenes and steroids. The flavonoids are principally kaempferol and quercetin derivatives. Some phenolic compounds, including gallic acid, chlorogenic acid, and caffeic acid, were also identified (19, 22).

The use of natural therapies for several diseases has a long history, and *B. forficata* has been traditionally used to treat liver and kidney conditions. The current work aimed to evaluate the nephroprotective and hepatoprotective potential of *Bauhinia forficata* leaf extract. Nephroprotection was analyzed by determining classic renal profiles as well as urinary and renal electrolyte profiles. The hepatoprotective effect was evaluated via the hepatic profiling. Considering the importance of kidney and liver-associated health conditions, the potential protective effect in mice using methanol extract from this natural resource is reported here for the first time. The extract was able to attenuate chemically induced kidney and liver damage in mice evidenced by reduced serum creatinine levels and prevention of elevated hepatic enzyme activity.

O extrato metanólico de *B. forficata* mostrou boas atividades antioxidantes e hipoglicêmicas (19). Com base na sua composição de terpenóides, foi verificada a sua atividade antibacteriana e fungicida. A utilização medicinal tradicional da infusão das folhas de *B. forficata* não tem registado casos de efeitos adversos tóxicos (19), embora estudos *in vitro* tenham demonstrado que, dependendo da dose, podem ocorrer danos mitocondriais, bem como atividades mutagénicas e disfunção da tiroide (20, 21).

Os principais constituintes de *B. forficata* nas folhas são compostos fenólicos, particularmente flavonóides, juntamente com terpenos e esteróides. Os flavonóides são principalmente derivados do kaempferol e da quercetina. Foram também identificados alguns compostos fenólicos, incluindo o ácido gálico, o ácido clorogénico e o ácido cafeico (19, 22).

O uso de terapias naturais para várias doenças tem uma longa história, e a *B. forficata* tem sido tradicionalmente usada para tratar doenças do fígado e dos rins. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial nefroprotector e hepatoprotector do extrato de folhas de *Bauhinia forficata*. A nefroprotecção foi analisada através da determinação dos perfis renais clássicos, bem como dos perfis urinário e eletrolítico renal. O efeito hepatoprotector foi avaliado através do perfil hepático. Considerando a importância das condições de saúde associadas aos rins e ao fígado, o potencial efeito protetor em ratinhos utilizando o extrato de metanol deste recurso natural é aqui relatado pela primeira vez. O extrato foi capaz de atenuar as lesões renais e hepáticas induzidas quimicamente em ratinhos, evidenciadas pela redução dos níveis de creatinina sérica e pela prevenção da atividade elevada das enzimas hepáticas.

Material and Methods

Plant material and extract preparation

The leaves of *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) were collected from the city of Itá, Central Department, Paraguay. The plant material was identified by researchers from the Department of Botany. A pressed and dried specimen is filed in the herbarium of the Facultad de Ciencias Químicas of Universidad Nacional de Asunción (FCQ-UNA), under the Code: Degen, González et González 4045. The extract of *B. forficata* was obtained by sonicating the dried and ground leaves in methanol (x3). The solvent was removed under reduced pressure on a rotary evaporator. The resulting extract was stored in a desiccator until used in biological assays. For this purpose, the extract was dissolved in water.

Reagents and equipment

Gentamicin (Larjan, Veinfar, Argentina), acetaminophen (Sigma, St. Louis, MO, USA) mosilymarin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and sodium pentobarbital from Abbott (Japan) were used. Methanol was purchased locally and distilled before use. The estimations of parameters of hepatic and kidney functionality were made with equipment (Autoanalyzer CB350i) and kits purchased from Wiener Lab (Rome, Italy). Electrolyte determinations were made with equipment (Combi-line) and reagents from Eschweiler (Kiel, Germany). A Hermle Z216M microcentrifuge was used (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). Metabolic cages were purchased from Suzhou Fengshi Laboratory Animal Equipment Co. Ltd (Suzhou City, China). Normal and pathological human serum (Humatrol, Wiesbaden-Germany) were used as quality controls.

Experimental animals and ethical issues

Toxicity tests were performed with female mice. Nephro- and hepatoprotection experiments were performed in adult (12 weeks old) male Swiss albino mice weighing 30 ± 5 g, apparently healthy, procured from the animal facility of the Facultad de Ciencias Químicas, kept in standard laboratory conditions (acclimated to a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and humidity of up to 60%, in rooms with 12/12h light/darkness cycles). The animals were fed daily (6 g/animal) and received water *ad libitum* throughout the experiment. For animal handling, the standards established by the Ethics Commission of the European Community were followed (23). The project protocol was approved by the Research Ethics Committee of the FCQ (Comité

Material e Métodos

Material vegetal e preparação do extrato

As folhas de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) foram coletadas na cidade de Itá, Departamento Central, no Paraguai. O material vegetal foi identificado por pesquisadores do Departamento de Botânica. Um espécime prensado e seco está arquivado no herbário da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Asunción (FCQ-UNA), sob o código: Degen, González et González 4045. O extrato de *B. forficata* foi obtido por sonicação das folhas secas e moídas em metanol (x3). O solvente foi removido sob pressão reduzida num evaporador rotativo. O extrato resultante foi armazenado num exsiccador até ser utilizado nos ensaios biológicos. Para este efeito, o extrato foi dissolvido em água.

Reagentes e equipamento

Foram utilizados gentamicina (Larjan, Veinfar, Argentina), acetaminofeno (Sigma, St. Louis, MO, EUA), mosilymarin (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e pentobarbital sódico (Abbott, Japão). O metanol foi adquirido localmente e destilado antes da utilização. As estimativas dos parâmetros de funcionalidade hepática e renal foram efectuadas com equipamento (Autoanalyzer CB350i) e kits adquiridos ao Wiener Lab (Roma, Itália). As determinações de electrólitos foram feitas com equipamento (Combi-line) e reagentes de Eschweiler (Kiel, Alemanha). Foi utilizada uma microcentrifugadora Hermle Z216M (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha). As gaiolas metabólicas foram adquiridas à Suzhou Fengshi Laboratory Animal Equipment Co. Ltd (Suzhou City, China). Foram utilizados soros humanos normais e patológicos (Humatrol, Wiesbaden-Alemanha) como controlos de qualidade.

Animais de laboratório e questões éticas

Os testes de toxicidade foram efectuados em ratinhos fêmeas. As experiências de nefro e hepatoprotecção foram realizadas em ratinhos albinos suíços machos adultos (12 semanas de idade), pesando 30 ± 5 g, aparentemente saudáveis, adquiridos no biotério da Facultad de Ciencias Químicas, mantidos em condições laboratoriais normais (aclimatados a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade até 60%, em salas com ciclos de 12/12h de luz/escurecimento). Os animais foram alimentados diariamente (6 g/animal) e receberam água *ad libitum* durante todo o experimento. Para a manipulação dos animais, foram seguidas as normas estabelecidas pela Comissão de

de Ética en Investigación, CEI 471/19). The animals were used only once, and for their final disposal, they were delivered to a company specialized in biological waste management.

Acute oral toxicity test

Toxicity test guidelines in protocol number 420 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) were followed. A group of five female mice received orally, cumulatively, every 24 hours, doses of 5 up to 2000 mg/kg of extract and were compared with a control group (n=5, distilled water). The animals were observed up to 8 hours after each treatment and subsequently for a period of 15 days. The presence of signs of toxicity, as well as their severity, progression, and reversibility, were sought and recorded in relation to dose and time. At the end of the observation period, the main organs were macroscopically examined (24).

Gentamicin-induced nephrotoxicity and treatments

The doses for assessment of the nephroprotective and hepatoprotective effect in mice were selected according to the higher doses tested in acute toxicity tests. In this case, no evidence of toxicity was observed in doses lower than 2000 mg/kg. Male mice divided into seven groups (n=6) received the treatment for nine days: control (Veh; water, *per os*); gentamicin (Gent; water 0.1 mL/10g body weight, *per os*, and gentamicin); reference hepatoprotection drug silymarin (Sil; 150 mg/kg body weight, silymarin, dissolved in ethanol: propylene glycol: water 1:4:5, *per os*, and gentamicin); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (containing 50, 100, 200 and 400 mg/kg of *B. forficata* methanol extract, respectively, *per os*, and gentamicin). Except in the control group, mice received the gentamicin (135 mg/kg; intraperitoneal) one hour after the treatments. This dose was standardized in previous studies in the mice procured from the animal facility of the Facultad de Ciencias Químicas. The weight of each mouse was recorded daily. On the ninth day, the mice were transferred to individual metabolic cages for 24 h to collect urine samples and quantify food consumption (16). The amount of food and the volume of water consumed during confinement in a metabolic box were also recorded. After the stay in metabolic cages, all animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and blood was collected.

Ética da Comunidade Europeia (23). O protocolo do projeto foi aprovado pelo Comité de Ética em Investigação da FCQ (Comité de Ética en Investigación, CEI 471/19). Os animais foram utilizados uma única vez e, para a sua eliminação final, foram entregues a uma empresa especializada na gestão de resíduos biológicos.

Teste de toxicidade oral aguda

Foram seguidas as directrizes para os testes de toxicidade do protocolo número 420 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Um grupo de cinco ratinhos fêmeas recebeu por via oral, cumulativamente, a cada 24 horas, doses de 5 a 2000 mg/kg de extrato e foram comparados com um grupo de controlo (n=5, água destilada). Os animais foram observados até 8 horas após cada tratamento e, posteriormente, durante um período de 15 dias. A presença de sinais de toxicidade, bem como a sua gravidade, progressão e reversibilidade, foram procuradas e registadas em função da dose e do tempo. No final do período de observação, os principais órgãos foram examinados macroscopicamente (24).

Nefrotoxicidade induzida pela gentamicina e tratamentos

As doses para avaliação do efeito nefroprotector e hepatoprotector em ratinhos foram seleccionadas de acordo com as doses mais elevadas testadas em ensaios de toxicidade aguda. Neste caso, não foi observada qualquer evidência de toxicidade em doses inferiores a 2000 mg/kg. Os ratinhos machos divididos em sete grupos (n=6) receberam o tratamento durante nove dias: controlo (Veh; água, *per os*); gentamicina (Gent; água 0.1 mL/10g de peso corporal, *per os*, e gentamicina); droga hepatoprotectora de referência silimarina (Sil; 150 mg/kg de peso corporal, silimarina, dissolvida em etanol: propilenoglicol: água 1:4:5, *per os*, e gentamicina); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (contendo 50, 100, 200 e 400 mg/kg de extrato metanólico de *B. forficata*, respetivamente, *per os*, e gentamicina). Exceto no grupo de controlo, os ratinhos receberam a gentamicina (135 mg/kg; intraperitoneal) uma hora após os tratamentos. Esta dose foi padronizada em estudos anteriores nos ratinhos adquiridos no biotério da Faculdade de Ciências Químicas. O peso de cada ratinho foi registado diariamente. No nono dia, os ratinhos foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais durante 24 h para recolher amostras de urina e quantificar o consumo de alimentos (16). A quantidade de alimentos e o volume de água consumidos durante o confinamento

Acetaminophen-induced hepatotoxicity and treatments

Mice were divided into seven groups (n=6). They were treated for four days: control (Veh; water, *per os*); acetaminophen (APAP; water, *per os*); silymarin (Sil; 150 mg/kg of silymarin, dissolved in ethanol: propylene glycol: water 1:4:5, *per os*); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (with 50, 100, 200 and 400 mg/kg of *B. forficata* extract, respectively, *per os*). On the fourth day, two hours after the oral treatment, except animals in control group, acute hepatotoxicity was induced in mice using acetaminophen (APAP, 300 mg/kg, intraperitoneal). This dose was standardized in previous studies in the mice procured from the animal facility of the Facultad de Ciencias Químicas (16). Three hours after acetaminophen administration, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and blood was collected. Alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT) and alanine aminotransferase (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) were determined (16) in serum.

Determination of biochemical parameters

In the nephroprotective activity assay, exsanguination of mice by cardiac puncture under anesthesia was made following removal from the metabolic cages. Serum was obtained after incubation of the fresh blood for 20 min at 37°C and centrifugation for 10 minutes at 3000 rpm. The concentrations of urea, creatinine, and uric acid (mg/dL), as well as potassium and sodium (mEq/L) were determined. The volume of urine after 24 hours was measured (mL), and in this sample, the concentrations of creatinine, urea, and uric acid (mg/kg/24h), together with sodium and potassium (mEq/kg/24h) were determined. The concentration of sodium and potassium in serum and urine was determined in the Eschweiler Combi-Line electrolyte meter. The equipment was duly calibrated and accredited under internal and external quality controls prior to the determination of the analytes. The direct ion selective electrode method was used for serum determinations, referring to the determination of electrolytes in whole samples without dilution. For the determination of electrolytes in urine, the indirect ion selective electrode method was used, where the sample undergoes a dilution prior to the determination.

na caixa metabólica também foram registrados. Após a permanência nas gaiolas metabólicas, todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e recolhida amostra de sangue.

Hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno e tratamentos

Os ratinhos foram divididos em sete grupos (n=6). Foram tratados durante quatro dias: controle (Veh; água, *por via oral*); acetaminofeno (APAP; água, *por via oral*); silimarina (Sil; 150 mg/kg de silimarina, dissolvida em etanol: propilenoglicol: água 1:4:5, *por via oral*); Bf 50, Bf 100, Bf 200, Bf 400 (com 50, 100, 200 e 400 mg/kg de extrato de *B. forficata*, respectivamente, *por via oral*). No quarto dia, duas horas após o tratamento oral, exceto nos animais do grupo de controle, foi induzida hepatotoxicidade aguda em ratinhos utilizando acetaminofeno (APAP, 300 mg/kg, intraperitoneal). Esta dose foi padronizada em estudos anteriores em ratinhos obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Químicas (16). Três horas após a administração de acetaminofeno, os ratinhos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e recolhida amostra de sangue. A fosfatase alcalina (ALP), a aspartato aminotransferase (transaminase glutâmico-oxaloacética, GOT) e a alanina aminotransferase (transaminase glutâmico-pirúvica, GPT) foram determinadas no soro (16).

Determinação dos parâmetros bioquímicos

No ensaio da atividade nefroprotectora, procedeu-se à exsanguinação dos ratinhos por punção cardíaca sob anestesia, após a remoção das gaiolas metabólicas. O soro foi obtido após incubação do sangue fresco durante 20 minutos a 37°C e centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. Foram determinadas as concentrações de ureia, creatinina e ácido úrico (mg/dL), bem como de potássio e sódio (mEq/L). Foi medido o volume de urina após 24 horas (mL) e, nesta amostra, foram determinadas as concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico (mg/kg/24h), bem como de sódio e potássio (mEq/kg/24h). A concentração de sódio e potássio no soro e na urina foi determinada no medidor de electrólitos Eschweiler Combi-Line. O equipamento foi devidamente calibrado e acreditado sob controlos de qualidade internos e externos antes da determinação dos analitos. Para as determinações no soro foi utilizado o método do elétrodo seletivo de iões direto, referente à determinação de electrólitos em amostras inteiras sem diluição. Para a determinação de electrólitos na urina, foi utilizado o método do elétrodo seletivo de iões indireto, em que a amostra é submetida a uma diluição antes da determinação.

In the hepatoprotective activity assay, GOT, GPT, and ALP were determined. Serum was obtained after incubating the fresh blood and then centrifuged. Internal quality control made using normal and pathological control serum. The activities of GOT, GPT and ALP were determined in a spectrophotometer at 340nm, and the results expressed in U/L (25, 26).

Statistical analysis

The results correspond to mean \pm standard deviation (SD), $p < 0.05$ was considered statistically significant. One way ANOVA, and Dunnett's test was done using the GraphPad Prism 7.0. (GraphPad Software, Inc., CA).

Results

Toxicity test results indicated that the methanol extract of *Bauhinia forficata* did not show a toxic effect during the observation period. No mortality was observed. No macroscopic differences or evidence of damage were observed between the organs (liver, lung, pancreas, heart, kidney) of animals in the control group and those treated with extract. The behavior of the animals was not altered. Moreover, water and food consumption in the treated and control groups were similar. Taken together these results indicate that the extract is safe up to 2000 mg/kg after oral administration (data not shown).

Determination of the nephroprotective effect

Male mice with kidney damage induced by gentamicin were used. The main marker of acute kidney injury is elevated serum creatinine concentration. After nine days, a statistically significant difference (Gent group 40% more than Veh, < 0.01) was observed between control (Veh) and pathological groups (Gent), validating this model to identify plant extracts with nephroprotective activity. A mild protective effect was observed in the group treated with silymarin, since serum creatinine level in this group was lower than in pathological group, but this difference was not significant. All tested doses of the extract significantly reduced the serum creatinine level (Bf 50 (78%) and Bf 100 (77%): $p < 0.05$; Bf 200 (63%): $p < 0.001$; Bf 400 (71%): $p < 0.01$; Figure 1 A), compared to Gent group. Urinary creatinine levels were not different, although the level in all groups treated with silymarin and the

No ensaio de atividade hepatoprotectora, foram determinadas a GOT, a GPT e a ALP. O soro foi obtido após incubação do sangue fresco e depois centrifugado. O controlo de qualidade interno foi efectuado utilizando soro de controlo normal e patológico. As actividades de GOT, GPT e ALP foram determinadas num espectrofotómetro a 340 nm, e os resultados expressos em U/L (25, 26).

Análise estatística

Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão (DP) considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. A ANOVA de uma via e o teste de Dunnett foram efectuados utilizando o GraphPad Prism 7.0. (GraphPad Software, Inc., CA).

Resultados

Os resultados dos testes de toxicidade indicaram que o extrato metanólico de *Bauhinia forficata* não apresentou um efeito tóxico durante o período de observação. Não foi observada qualquer mortalidade. Não foram observadas diferenças macroscópicas ou evidências de danos entre os órgãos (fígado, pulmão, pâncreas, coração, rim) dos animais do grupo de controlo e dos animais tratados com o extrato. O comportamento dos animais não foi alterado. Além disso, o consumo de água e de alimentos nos grupos tratados e de controlo foi semelhante. Em conjunto, estes resultados indicam que o extrato é seguro até 2000 mg/kg após administração oral (dados não mostrados).

Determinação do efeito nefroprotector

Foram utilizados ratinhos machos com lesões renais induzidas pela gentamicina. O principal marcador de lesão renal aguda foi a elevada concentração de creatinina no soro. Após nove dias, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de controlo (Veh) e patológico (Gent) (grupo Gent 40% mais do que Veh, $< 0,01$), validando este modelo para identificar extractos de plantas com atividade nefroprotectora. Foi observado um efeito protetor ligeiro no grupo tratado com silimarina, uma vez que o nível de creatinina sérica neste grupo foi inferior ao do grupo patológico, mas esta diferença não foi significativa. Todas as doses testadas do extrato reduziram significativamente o nível de creatinina sérica (Bf 50 (78%) e Bf 100 (77%): $p < 0,05$; Bf 200 (63%): $p < 0,001$; Bf 400 (71%): $p < 0,01$; Figura 1 A), em comparação com o grupo Gent. Os níveis de creatinina urinária não foram diferentes, embora os níveis em todos os grupos tratados com silimarina

extract, were comparable to the value in control group and lower than the pathological group (Figure 1 B).

Serum and urinary urea levels (Figures 2 A and B) were not altered after the treatment with *B. forficata*, when compared with the Gent group. Although serum urea levels showed a reduction in animals treated with all doses of the extract, this difference was not significant (Figure 2 A).

e extrato fossem comparáveis ao valor do grupo de controlo e inferiores aos do grupo patológico (Figura 1 B).

Os níveis séricos e urinários de ureia (Figuras 2 A e B) não foram alterados após o tratamento com *B. forficata*, quando comparados com o grupo Gent. Embora os níveis séricos de ureia tenham apresentado uma redução nos animais tratados com todas as doses do extrato, esta diferença não foi significativa (Figura 2 A).

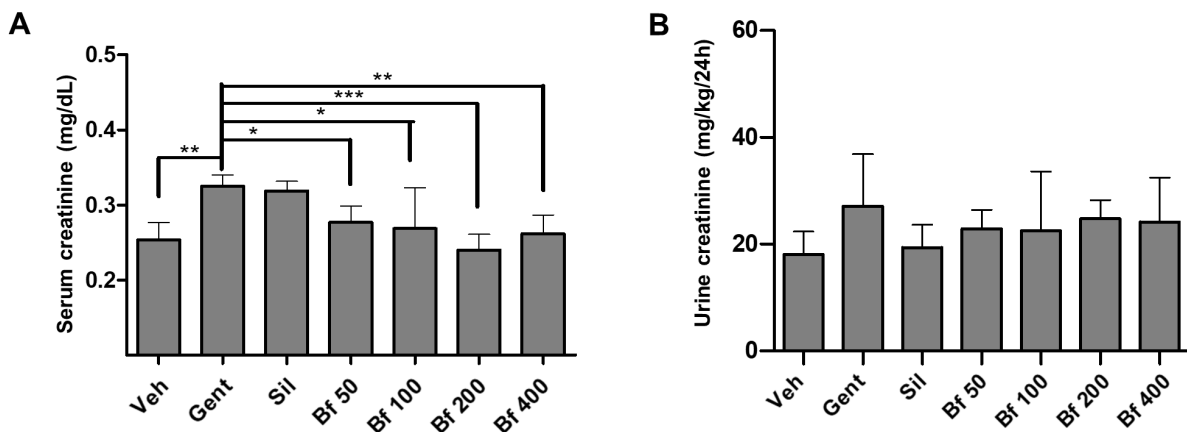


Figure 1 - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of creatinine in serum (A) and urine (B), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean \pm SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 significantly different from Gent).

Figura 1 - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de creatinina no soro (A) e na urina (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média \pm DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 significativamente diferente de Gent).

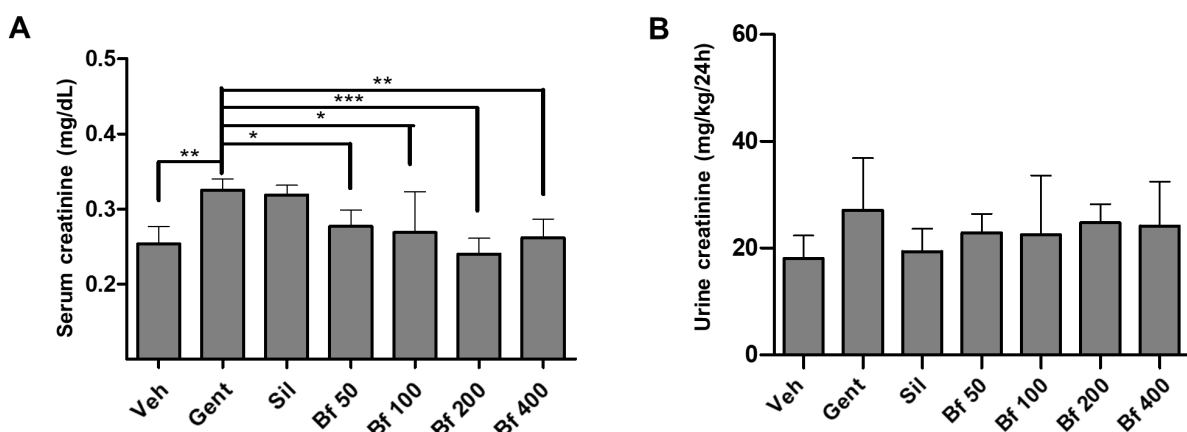


Figure 2 - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of urea in serum (A) and urine (B), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean \pm SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. * p<0.05 significantly different from Gent.

Figura 2 - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de ureia no soro (A) e na urina (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média \pm DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. * p<0,05 significativamente diferente de Gent.

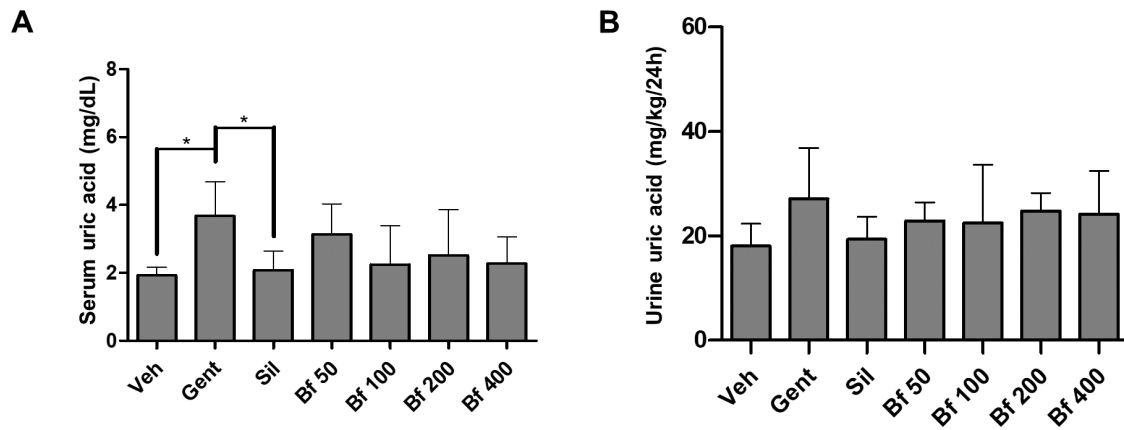


Figure 3 - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of uric acid in serum (A) and urine (B), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean \pm SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. * $p < 0.05$ significantly different from Gent.

Figura 3 - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de ácido úrico no soro (A) e na urina (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média \pm DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. * $p < 0,05$ significativamente diferente de Gent.

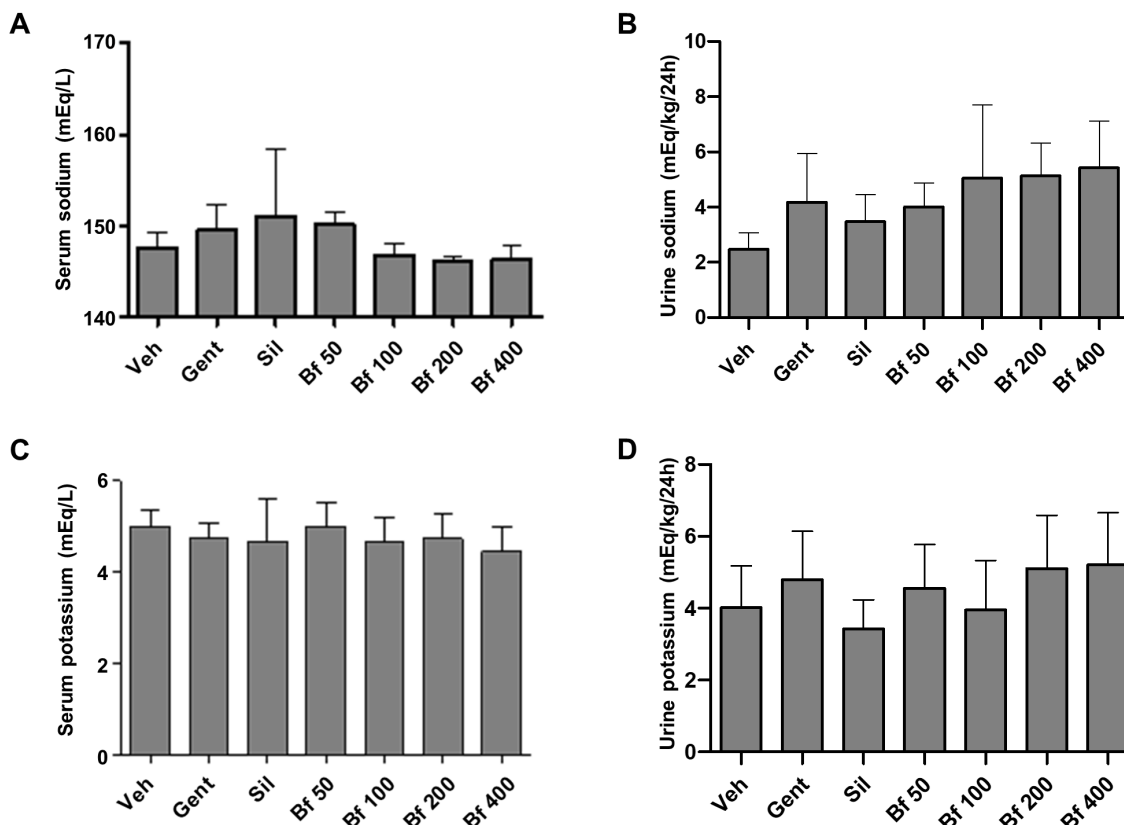


Figure 4 - Effect of *Bauhinia forficata* on the concentration of sodium in serum (A) and urine (B), and of potassium in serum (C) and urine (D), in mice treated with Veh: water, Gent: gentamicin, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean \pm SD (n=6), one-way ANOVA, post hoc Dunnett's test. * $p < 0.05$ significantly different from Gent.

Figura 4 - Efeito da *Bauhinia forficata* na concentração de sódio no soro (A) e na urina (B) e de potássio no soro (C) e na urina (D), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média \pm DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett. * $p < 0,05$ significativamente diferente de Gent.

Pathological group (Gent) serum uric acid concentration was significantly higher compared to the control (86%, $p < 0.05$), and silymarin (64%, $p < 0.05$). Animals treated with the extract (50, 100, 200 and 400 mg/kg), exhibited lower concentrations than the Gent group and were closer to the silymarin (Sil) group. The levels of uric acid in urine were similar in all groups (Figures 3A and 3B). No differences were seen in serum and urine sodium and potassium levels (Figures 4 A-D).

Finally, diuresis, body weight, food intake and water consumption of the animals were evaluated. A significant difference was observed between the diuresis of the pathological group (Gent) compared to the control group (Veh), as the urine volume in the Gent group was higher. The animals with kidney damage suffered a significant weight loss compared to the control group, while the animals treated with the extract (50, 100, 200, and 400 mg/kg) maintained the body weight closely related to the control group. There was no variation in terms of food or water intake by the animals (Figures 5A and 5B).

A concentração sérica de ácido úrico do grupo patológico (Gent) foi significativamente mais elevada em comparação com o controlo (86%, $p < 0,05$) e com a silimarina (64%, $p < 0,05$). Os animais tratados com o extrato (50, 100, 200 e 400 mg/kg), exibiram concentrações mais baixas do que o grupo Gent e estavam mais próximos do grupo da silimarina (Sil). Os níveis de ácido úrico na urina foram semelhantes em todos os grupos (Figuras 3A e 3B). Não foram observadas diferenças nos níveis de sódio e potássio no soro e na urina (Figuras 4 A-D).

Por fim, foram avaliados a diurese, o peso corporal, a ingestão de alimentos e o consumo de água dos animais. Foi observada uma diferença significativa entre a diurese do grupo patológico (Gent) e a do grupo de controlo (Veh), uma vez que o volume de urina no grupo Gent era mais elevado. Os animais com lesões renais sofreram uma perda de peso significativa em comparação com o grupo de controlo, enquanto os animais tratados com o extrato (50, 100, 200 e 400 mg/kg) mantiveram o peso corporal muito próximo do grupo de controlo. Não se registou qualquer variação em termos de ingestão de alimentos ou de água pelos animais (Figuras 5A e 5B).

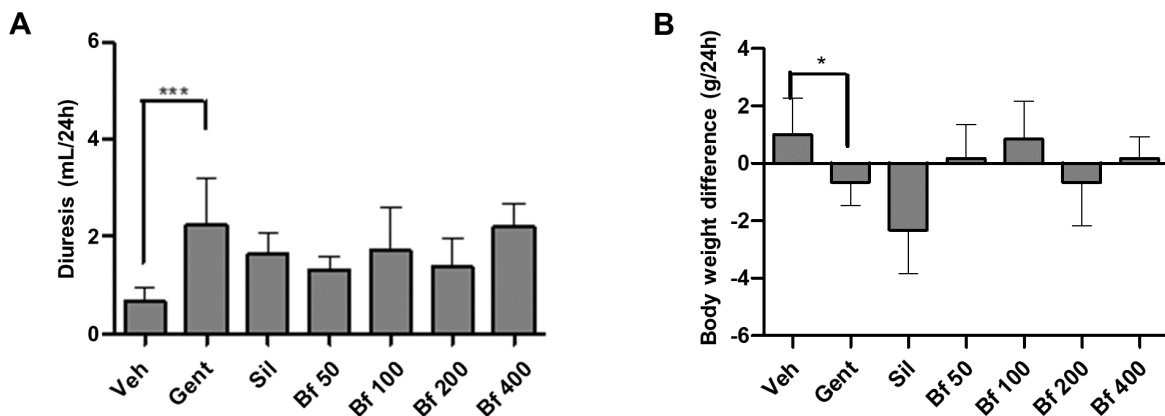


Figure 5 - Effect of *Bauhinia forficata* na diurese (A) e na diferença de peso corporal (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média \pm DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett.

Figura 5 - Efeito da *Bauhinia forficata* na diurese (A) e na diferença de peso corporal (B), em ratinhos tratados com Veh: água, Gent: gentamicina, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são expressos como média \pm DP (n=6), ANOVA de uma via, teste post hoc de Dunnett.

Determination of hepatoprotective effect

The main marker of liver damage is the activity of the enzyme GPT. A significant difference ($p < 0.01$) was found between the control group (Veh) and the pathological group (APAP), and between the APAP group and silymarin (Sil, $p < 0.01$). With these results, the validity of the method for this type of study was verified. *B. forficata* extract prevented the elevation of GPT enzyme activity, evidenced by a significant difference between GPT levels when compared to the APAP group (50, $p < 0.01$; 100, $p < 0.01$; 200, $p < 0.01$; 400 $p < 0.05$ mg/kg).

Determinação do efeito hepatoprotector

O principal marcador de danos no fígado foi a atividade da enzima GPT. Encontrámos uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre o grupo de controlo (Veh) e o grupo patológico (APAP), e entre o grupo APAP e a silimarina (Sil, $p < 0,01$). Com estes resultados, verificou-se a validade do método para este tipo de estudo. O extrato de *B. forficata* preveniu a elevação da atividade da enzima GPT, evidenciada por uma diferença significativa entre os níveis de GPT quando comparados com o grupo APAP (50, $p < 0,01$; 100, $p < 0,01$; 200, $p < 0,01$; 400 $p < 0,05$ mg/kg).

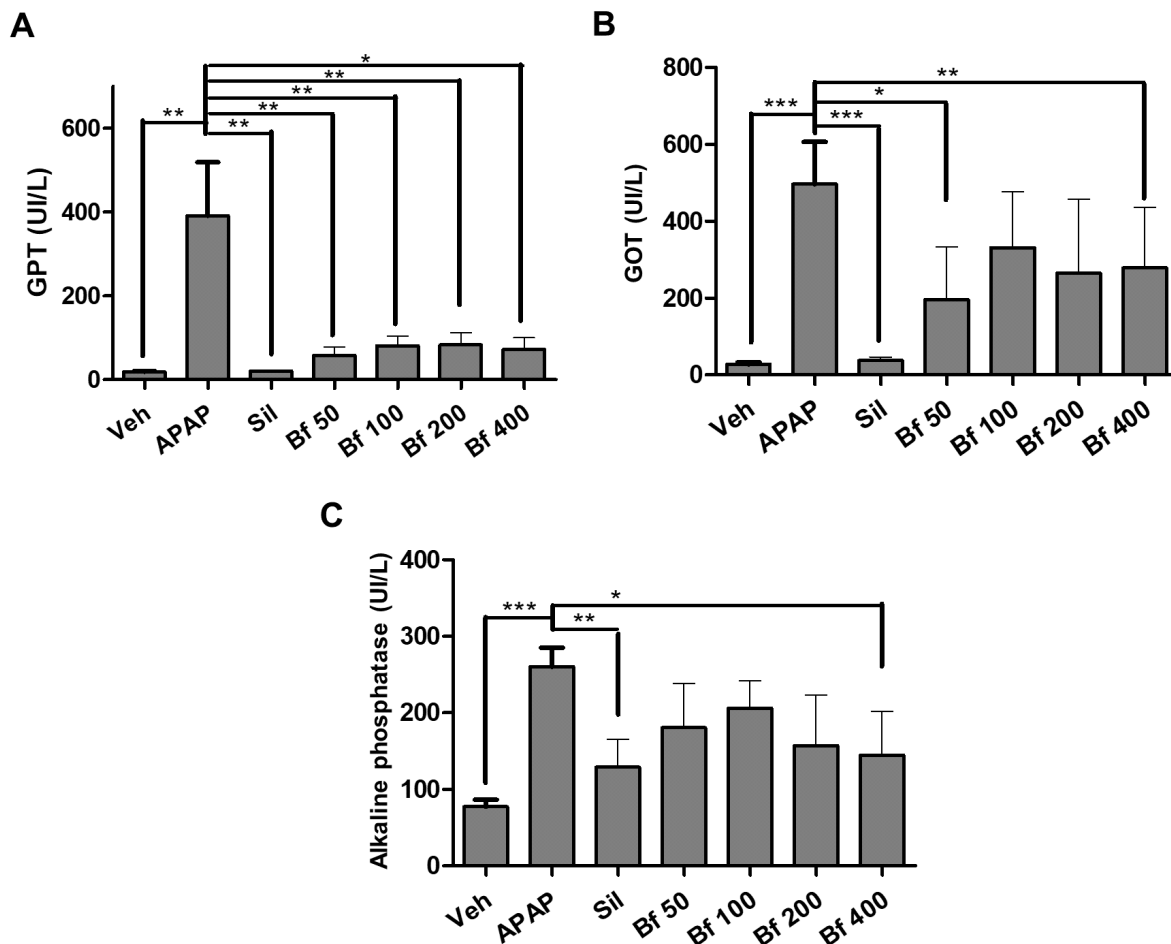


Figure 6 - Serum levels (U/l) of GOT (A), GPT (B), and Alkaline phosphatase (C) of mice ($n = 6$) treated with *Bauhinia forficata* leaves extract. Veh: water, APAP: acetaminophen, Sil: silymarin, Bf 50, Bf 100, Bf 200 and Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.). The data are plotted as average \pm SD. ANOVA of one factor, followed by the Dunnett's test was used, $p < 0.05$ was considered statistically significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, significantly different from APAP).

Figura 6 - Níveis séricos (U/l) de GOT (A), GPT (B) e fosfatase alcalina (C) de ratinhos ($n = 6$) tratados com extrato de folhas de *Bauhinia forficata*. Veh: água, APAP: acetaminofeno, Sil: silimarina, Bf 50, Bf 100, Bf 200 e Bf 400 (*B. forficata* 50, 100, 200 e 400 mg/kg, p.o.). Os dados são apresentados como média \pm DP. ANOVA de um fator, seguido pelo teste de Dunnett foi usado, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, significativamente diferente do APAP).

Regarding the activity of the GOT enzyme, the pathological group (APAP) showed a significant difference ($p < 0.001$) compared to the animals in control group (Veh) and the animals treated with silymarin (Sil). *B. forficata* extract prevented the increase in enzyme activity produced by paracetamol, moreover, 50 ($p < 0.05$) and 400 ($p < 0.01$) mg/kg showed significant differences when compared to the APAP group.

Finally, the activity of the enzyme alkaline phosphatase was determined. The pathological group (APAP) ALP activity was statistically different ($p < 0.001$) from control (Veh) and silymarin (Sil, $p < 0.01$) groups. In the groups that received the extract, the activity decreased, the difference with the APAP group was significant ($p < 0.05$) in the group of animals treated with 400 mg/kg of *B. forficata* (Figures 6A-C).

Discussion

Medicinal plants as potential therapeutic agents are of vital importance throughout the world's healthcare system. Several plants demonstrated their efficacy and could be used as a therapeutic alternative to prevent and treat various liver and kidney conditions. The methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves tested in this study proved to be safe at least up to 2000 mg/kg based on acute toxicity tests performed on mice, and results described previously. It has previously been reported that this plant is safe to use and does not present drug interactions (19). The nephroprotective and hepatoprotective effects were evaluated in our study using models of chemically induced kidney and liver injury in Swiss albino mice.

Aminoglycosides have nephrotoxic effects due to the induction of Reactive oxygen species (ROS) and depletion of antioxidant enzyme activities in the kidney. Gentamicin administration caused marked changes in kidney tubules due to gentamicin reabsorption in proximal convoluted tubules, causing degeneration and necrosis of the epithelial cells of the tubules. These changes were manifested by dilated tubules, loss of brush border, severe leucocyte infiltrations, tubular degeneration, and presence of tubular casts (27).

Gentamicin-induced kidney damage is mainly characterized by an increase in serum creatinine concentration, which indicates a reduction in

Em relação à atividade da enzima GOT, o grupo patológico (APAP) apresentou uma diferença significativa ($p < 0,001$) em comparação com os animais do grupo de controlo (Veh) e os animais tratados com silimarina (Sil). O extrato de *B. forficata* impediu o aumento da atividade enzimática produzido pelo paracetamol, além disso, 50 ($p < 0,05$) e 400 ($p < 0,01$) mg/kg mostraram diferenças significativas quando comparados com o grupo APAP.

Finalmente, foi determinada a atividade da enzima fosfatase alcalina. A atividade da ALP do grupo patológico (APAP) foi estatisticamente diferente ($p < 0,001$) dos grupos de controlo (Veh) e silimarina (Sil, ($p < 0,01$)). Nos grupos que receberam o extrato, a atividade diminuiu, mas a diferença com o grupo APAP foi significativa ($p < 0,05$) no grupo de animais que foi tratado com 400 mg/kg de *B. forficata* (Figuras 6A-C).

Discussão

As plantas medicinais como potenciais agentes terapêuticos são de importância vital em todos os sistemas de saúde. Várias plantas provaram ser alternativas terapêuticas eficazes na prevenção e tratamento de diversas doenças do fígado e dos rins. O extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* testado neste estudo provou ser seguro, pelo menos até 2000 mg/kg, com base em testes de toxicidade aguda realizados em ratos e nos resultados descritos anteriormente. Foi anteriormente referido que esta planta é segura para utilização e não apresenta interações medicamentosas (19). Os efeitos nefroprotectores e hepatoprotectores foram avaliados em ratinhos albinos suíços utilizando modelos de lesão renal e hepática quimicamente induzidas.

Os aminoglicosídeos têm efeitos nefrotóxicos devido à indução de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e à depleção das actividades das enzimas antioxidantes no rim. A administração de gentamicina provocou alterações acentuadas nos túbulos renais devido à reabsorção de gentamicina nos túbulos contorcidos proximais, causando degeneração e necrose das células epiteliais dos túbulos. Estas alterações manifestaram-se através de túbulos dilatados, perda do bordo em escova, infiltrações leucocitárias graves, degeneração tubular e presença de cilindros tubulares (27).

A lesão renal induzida pela gentamicina caracteriza-se principalmente por um aumento da concentração de creatinina sérica, o que indica uma redução da

glomerular filtration rate, and is also frequently associated with an increase in serum urea and uric acid concentration (28). Our results showed that daily administration for nine days (Gent group) increased creatinine, urea, and uric acid in serum in agreement with other results reported (28, 29). The concentration of creatinine in urine was also slightly increased, as expected (29, 30).

APAP is the most used model of intrinsic drug-induced liver injury. APAP is converted to an electrophile thought to be N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), catalyzed by cytochrome P450 enzymes. NAPQI then binds to sulfhydryl groups on glutathione and proteins. Depletion of GSH makes the cells more susceptible to oxidative stress (31). Hepatotoxicity was achieved by intraperitoneal administration of paracetamol, 300 mg/kg body weight, used as a single administration on the last day of treatment. Liver damage was evidenced by elevated activity of liver enzymes GPT, GOT, and ALP (15-17).

Silymarin (150 mg/kg) was used in both nephroprotection and hepatoprotection assays, as previously described. The use of silymarin as a positive control in hepatoprotection models has been widely documented and validated in this type of study (15, 16, 17, 30, 32). In addition, the mechanism of the hepatoprotective effect of silymarin has been previously detailed (8). In contrast, in nephroprotection assay models, the use of silymarin to prevent kidney damage is more limited; despite this, it is still the most used option in this type of research (15, 32).

Silymarin attenuated the toxic effect of gentamicin in mice (Sil group). Some reports have indicated that silymarin has a modest nephroprotection effect against damage from nephrotoxic agents such as gentamicin (8), and its nephroprotective effect was demonstrated in previous research in our laboratory (16).

All animals treated with the doses tested of the methanolic extract of *B. forficata* leaves (50, 100, 200 and 400 mg/kg) prevented kidney damage caused by gentamicin, evidenced mainly by reduced creatinine levels in serum (33, 34), compared to the pathological group (Gent). Serum urea and uric acid in the groups treated with the extract was closer to the value measured in control group (Veh), as reported in the literature when nephroprotective potential of *Carica papaya* seeds (35) and *Croton zambesicus* root (36) extracts were evaluated.

taxa de filtração glomerular, estando frequentemente associada a um aumento da concentração sérica de ureia e de ácido úrico (28). Os nossos resultados mostraram que a administração diária de gentamicina durante nove dias (grupo Gent) aumentou a creatinina, a ureia e o ácido úrico no soro, em concordância com outros resultados relatados (28, 29). A concentração de creatinina na urina também aumentou ligeiramente, como esperado (29, 30).

O APAP é o modelo mais utilizado de lesão hepática intrínseca induzida por fármacos. O APAP é convertido num eletrófilo que se pensa ser a N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), catalisado pelas enzimas do citocromo P450. A NAPQI liga-se então a grupos sulfidrilo no glutatião e nas proteínas. A depleção de GSH torna as células mais susceptíveis ao stress oxidativo (31). A hepatotoxicidade foi conseguida através da administração intraperitoneal de paracetamol, 300 mg/kg de peso corporal, utilizada como administração única no último dia de tratamento. A lesão hepática foi evidenciada pela atividade elevada das enzimas hepáticas GPT, GOT e ALP (15-17).

A silimarina (150 mg/kg) foi utilizada nos ensaios de nefroprotecção e hepatoprotecção, como previamente descrito. A utilização da silimarina como controlo positivo em modelos de hepatoprotecção foi amplamente documentada e validada neste tipo de estudo (15, 16, 17, 30, 32). Além disso, o mecanismo do efeito hepatoprotector da silimarina foi previamente detalhado (8). Em contrapartida, nos modelos de ensaio de nefroprotecção, a utilização da silimarina para prevenir lesões renais é mais limitada; apesar disso, continua a ser a opção mais utilizada neste tipo de investigação (15, 32).

A silimarina atenuou o efeito tóxico da gentamicina em ratinhos (grupo Sil). Alguns relatórios indicaram que a silimarina tem um efeito modesto de nefroprotecção contra danos causados por agentes nefrotóxicos como a gentamicina (8), e o seu efeito nefroprotector foi demonstrado em investigações anteriores no nosso laboratório (16).

Todos os animais tratados com as doses testadas do extrato metanólico das folhas de *B. forficata* (50, 100, 200 e 400 mg/kg) preveniram a lesão renal causada pela gentamicina, evidenciada principalmente pela redução dos níveis de creatinina no soro (33, 34), em comparação com o grupo patológico (Gent). A ureia e o ácido úrico séricos nos grupos tratados com o extrato estavam mais próximos do valor medido no grupo de controlo (Veh), tal como referido na literatura quando foi avaliado o potencial nefroprotector dos extractos das sementes de *Carica papaya* (35) e da raiz de *Croton zambesicus* (36).

Considering that the plant is popularly used for the treatment of kidney disorders, the concentrations of creatinine, urea, and uric acid in urine, together with serum and urinary sodium and potassium were also measured. It was determined that the *B. forficata* extract had no significant effects on these parameters (urinary creatinine, urea, and uric acid), in agreement with previous works reported on *Butea monosperma* and *Piper cubeba* (33, 34). Likewise, no difference was found between electrolyte levels, neither in serum nor in urine, as reported for *Carica papaya* (35) and *Croton zambesicus* (36). This is likely because these electrolytes are subject to complex physiological, metabolic, and hormonal regulations (35), so no significant changes have been seen in the levels of these components in the established experimental conditions. The complex regulation includes renal excretion, water intake, electrolytes balance, osmolarity, and volume of body fluids, regulated by vasopressin, aldosterone, and the effect of osmoreceptors, among others (37).

Finally, diuresis, body weight variation, food consumption, and water intake of the different test groups were also evaluated after 24 hours in metabolic cages. Diuresis augmented in Gent group, due to decreased number of functioning nephrons and increased filtration rate. Some evidence indicates that aminoglycosides interfere with the action of vasopressin on the distal nephron (38). The increased diuresis in all groups treated with the extract, compared to the control group is due to the flavonoids content, previously reported as being responsible for diuresis (19). The analysis of body weight, food, and drink has not been reported previously, it was considered that they could contribute to the enrichment of the experimental model used, providing new evidence in the pathological models used. The pathological group had lower body weight ($p < 0.05$), and lower food and water intake (although not significant differences). Significant reduction in body weight in rats with kidney damage induced by gentamicin in a 22 day experiment were reported previously (39). In this study, differences reported correspond to the animals' weight after 24 hours in metabolic cages.

Regarding the hepatoprotection test of the *B. forficata* extract, it was shown that all the doses tested (50, 100, 200 and 400 mg/kg) proved to be effective in protecting mice from liver damage caused

Tendo em conta que a planta é utilizada popularmente para o tratamento de distúrbios renais, foram também medidas as concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico na urina, juntamente com o sódio e o potássio séricos e urinários. Concluímos que o extrato de *B. forficata* não tinha efeitos significativos nestes parâmetros (creatinina urinária, ureia e ácido úrico), em concordância com trabalhos anteriores relatados em *Butea monosperma* e *Piper cubeba* (33, 34). Da mesma forma, não se verificou qualquer diferença entre os níveis de electrólitos, nem no soro nem na urina, tal como referido para *Carica papaya* (35) e *Croton zambesicus* (36). Isto deve-se provavelmente ao facto de estes electrólitos estarem sujeitos a uma regulação fisiológica, metabólica e hormonal complexa (35), pelo que não foram observadas alterações significativas nos níveis destes componentes nas condições experimentais estabelecidas. A complexa regulação inclui a excreção renal, a ingestão de água, o equilíbrio dos electrólitos, a osmolaridade e o volume dos fluidos corporais, regulados pela vasopressina, aldosterona e o efeito dos osmorreceptores, entre outros (37).

Finalmente, a diurese, a variação do peso corporal, o consumo de alimentos e a ingestão de água dos diferentes grupos de teste foram também avaliados após 24 horas em gaiolas metabólicas. A diurese aumentou no grupo Gent, devido à diminuição do número de nefrónios funcionais e ao aumento da taxa de filtração. Algumas evidências indicam que os aminoglicosídeos interferem com a ação da vasopressina no néfron distal (38). O aumento da diurese em todos os grupos tratados com o extrato, em comparação com o grupo de controlo, deve-se ao conteúdo de flavonóides, previamente relatado como sendo responsável pela diurese (19). A análise do peso corporal, da alimentação e da bebida não foi relatada anteriormente, considerou-se que poderiam contribuir para o enriquecimento do modelo experimental utilizado, fornecendo novas evidências nos modelos patológicos utilizados. O grupo patológico apresentou menor peso corporal ($p < 0,05$), e menor ingestão de alimentos e água (embora sem diferenças significativas). Uma redução significativa do peso corporal em ratinhos com lesão renal induzida por gentamicina numa experiência de 22 dias foi relatada anteriormente (39). Neste estudo, as diferenças relatadas correspondem ao peso dos animais após 24 horas em gaiolas metabólicas.

No que diz respeito ao teste de hepatoprotecção do extrato de *B. forficata*, verificou-se que todas as doses testadas (50, 100, 200 e 400 mg/kg) se revelaram eficazes na proteção dos ratinhos contra as lesões hepáticas causadas pelo paracetamol. Estes resultados

by paracetamol. These results agree with those obtained with another species of the same genus, *Bauhinia variegata* (40). The presence of gallic acid and at least 39 flavonoids, such as rutin, quercetin and kaempferol has been reported in *Bauhinia forficata* (22, 41, 42). These compounds have antioxidant properties due to the ability to neutralize oxidizing species such as superoxide radicals. The antioxidant activity of *B. forficata* has been widely demonstrated and associated with flavonoid composition (19), as the activity reported in studies of an extract of *Bauhinia variegata* leaves (12). Hepatoprotective effect in diabetic mice was previously reported, and the effect attributed to the phenolic content (43). Moreover, the presence of trigonelline, an antioxidant alkaloid, has also been reported (44). Other species, with components in common such as *Opuntia ficus indica* and *Zea mais*, demonstrated a similar hepatoprotective effect, so it could be that the intrinsic mechanism by which these plants exert their effect is associated with the antioxidant capacity (15).

Different pharmacological activities have been reported for many *Bauhinia* species, including hepatoprotective and antioxidant. The leaves of *Bauhinia forficata* are reported to have antidiabetic, antioxidant, antibacterial, antiproliferative, antiulcerogenic, anti-inflammatory, and hepatoprotective effects in diabetic mice, among others (19). The present study was carried out to evaluate the protective activities of the methanol extract of *Bauhinia forficata* leaves in mice induced to acute hepatotoxicity and nephrotoxicity. These preliminary results indicate that it will be important to continue with the evaluation of the effect of this extract on other parameters that allow us to determine the antioxidant capacity, and the anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions. More studies are required to understand mechanistic pathways of protection observed.

Conclusion

The preliminary evaluation of the methanolic extract of *Bauhinia forficata* leaves demonstrated moderate nephroprotective activity in mice with kidney damage induced by gentamicin, achieving significant control over the alteration of serum creatinine concentration. The extract slightly affected the serum urea and uric acid values and had very little effect on the urine parameters measured. In addition, it was shown that the extract has a marked hepatoprotective activity. Our in vivo results partially validate the popular use

estão de acordo com os obtidos com outra espécie do mesmo género, *Bauhinia variegata* (40). A presença de ácido gálico e de pelo menos 39 flavonóides, como a rutina, a quercetina e o kaempferol, foi registada na *Bauhinia forficata* (22, 41, 42). Estes compostos têm propriedades antioxidantes devido à capacidade de neutralizar espécies oxidantes, como os radicais superóxido. A atividade antioxidante da *B. forficata* tem sido amplamente demonstrada e associada à composição de flavonóides (19), tal como a atividade relatada em estudos de um extrato de folhas de *Bauhinia variegata* (12). O efeito hepatoprotector em ratinhos diabéticos foi previamente relatado, e o efeito atribuído ao conteúdo fenólico (43). Além disso, foi também registada a presença de trigonelina, um alcaloide antioxidante (44). Outras espécies, com componentes em comum, como *Opuntia ficus indica* e *Zea mais*, demonstraram um efeito hepatoprotector semelhante, pelo que pode ser que o mecanismo intrínseco pelo qual estas plantas exercem o seu efeito esteja associado à sua capacidade antioxidante (15).

Foram relatadas diferentes actividades farmacológicas para muitas espécies de *Bauhinia*, incluindo as hepatoprotectora e antioxidante. As folhas de *Bauhinia forficata* têm efeitos antidiabéticos, antioxidantes, antibacterianos, antiproliferativos, antiulcerogénicos, anti-inflamatórios e hepatoprotectores em ratinhos diabéticos, entre outros (19). O presente estudo foi realizado para avaliar as actividades protectoras do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* em ratinhos induzidos a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade agudas. Estes resultados preliminares indicam que será importante continuar com a avaliação do efeito deste extrato noutros parâmetros que nos permitam determinar a capacidade antioxidante e as acções anti-inflamatórias e anti-stress oxidativo. São necessários mais estudos para compreender as vias mecanicistas da protecção observada.

Conclusão

A avaliação preliminar do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia forficata* demonstrou uma atividade nefroprotectora moderada em ratinhos com lesões renais induzidas pela gentamicina, conseguindo um controlo significativo da alteração da concentração de creatinina sérica. O extrato afectou ligeiramente os valores séricos de ureia e ácido úrico e teve um efeito muito reduzido nos parâmetros de urina medidos. Além disso, foi demonstrado que o extrato tem uma atividade

of *B. forficata*. More experiments will be required to evaluate its effects on tissues, elucidate the mechanism and identify the compounds responsible for the effect observed.

Funding sources

This research was supported by Facultad de Ciencias Químicas, and Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, from Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. SFR conducted the work during her master's program (MCB) supported by CONACYT, PROCIENCIA Program, resources from FEEL of FONACIDE, Paraguay (PROCIENCIA POSG17-59).

Author contributions

SFR and AKG performed assays and collected data. SFR, MLK and MACB analyzed the data. PMFT, MAC-B, and MLK conceived and designed the experiments. MAC-B and MLK wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank the team of Professor R. Degen, who collected and identified the plant material, Dr. N. Alvarenga, who provided the extract, and Mr. N. Kennedy for the English language revision.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

hepatoprotectora marcada. Os nossos resultados in vivo validam parcialmente a utilização popular da *B. forficata*. Serão necessárias mais experiências para avaliar os seus efeitos nos tecidos, elucidar o mecanismo e identificar os compostos responsáveis pelo efeito observado.

Fontes de financiamento

Esta pesquisa foi apoiada pela Facultad de Ciencias Químicas e pelo Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, da Universidad Nacional de Asunción, Paraguai. SFR realizou o trabalho durante seu programa de mestrado (MCB) apoiado pelo CONACYT, Programa PROCIENCIA, recursos do FEEL do FONACIDE, Paraguai (PROCIENCIA POSG17-59).

Contribuição dos autores

SFR e AKG efectuaram ensaios e recolheram dados. SFR, MLK e MACB analisaram os dados. PMFT, MAC-B e MLK conceberam e projectaram as experiências. MAC-B e MLK redigiram o artigo. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à equipa do Professor R. Degen, que recolheu e identificou o material vegetal, ao Dr. N. Alvarenga, que forneceu o extrato, e ao Sr. N. Kennedy pela revisão da língua inglesa.

Conflitos de interesses

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

References / Referências

1. Cosola, C., Sabatino, A, Di Bari, I., Fiaccadori, E., & Gesualdo, L. (2018). Nutrients, Nutraceuticals, and Xenobiotics Affecting Renal Health. *Nutrients*, 10(7), 808. <https://doi.org/10.3390/nu10070808>
2. Gu, X., & Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert reviews in molecular medicine*, 14, e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
3. Prikhodko, V., Bezborodkina, N. & Okovityi, S. (2022). Pharmacotherapy for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Emerging Targets and Drug Candidates. *Biomedicines*, 10(2), 274. doi: 10.3390/biomedicines10020274
4. Instituto Nacional de Nefrología. (2019). Informe INN, Hemodiálisis Crónica. Available at: <6b307e-Informe2019INN.pdf> (mispbs.gov.py)
5. Luyckx, V. A., Al-Aly, Z., Bello, A. K., Bellorin-Font, E., Carlini, R. G., Fabian, J., Garcia-Garcia, G., Iyengar, A., Sekkarie, M., van Biesen, W., Ulasi, I., Yeates, K., & Stanifer, J. (2021). Sustainable Development Goals relevant to kidney health: an update on progress. *Nature reviews. Nephrology*, 17(1), 15–32. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00363-6>
6. Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2023). Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
7. Ye, F., Zhai, M., Long, J., Gong, Y., Ren, C., Zhang, D., Lin, X., & Liu, S. (2022). The burden of liver cirrhosis in mortality: Results from the global burden of disease study. *Frontiers in public health*, 10, 909455. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.909455>
8. Kim, Y., Na, J., Kwon, D. & Park, J. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity via up-regulation of the glutathione conjugation capacity in mice. *Journal of functional food*, 49, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.025>
9. Adeneye, A. & Benebo, A. (2008). Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.025>
10. Khan, S. A., Priyamvada, S., Farooq, N., Khan, S., Khan, M. W., & Yusufi, A. N. (2009). Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacological research*, 59(4), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.12.009>
11. Dungca, N. (2016). Protective effect of the methanolic leaf extract of *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Asteraceae) against gentamicin-induced nephrotoxicity in Sprague Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 18–21. doi:10.1016/j.jep.2016.03.002
12. Bashandy, S. A. E., El Awdan, S. A., Mohamed, S. M., & Omara, E. A. A. (2020). *Allium porrum* and *Bauhinia Variegata* mitigate acute liver failure and nephrotoxicity induced by thioacetamide in male rats. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 35(2), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s12291-018-0803-5>
13. Hina, G., Muhammad, A., Salina, S., Yazeed, A., Falak, S., Eilaf, A., Umara, A., Syed, M., Asghar, K., Muhammad, G. & Ghazala, K. (2021). Quantification of biochemical compounds in *Bauhinia Variegata* Linn flower extract and its hepatoprotective effect. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.056>
14. Oliveira, G. O., Braga, C. P., & Fernandes, A. A. (2013). Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.&Endl.)] treatment. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.050>
15. Ben Saad, A., Dalel, B., Rjeibi, I., Smida, A., Ncib, S., Zouari, N., & Zourgui, L. (2017). Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 516–525. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1255976>
16. Soverina, M., Campuzano-Bublitz, M., Centurión, J., Galeano, A. & Kennedy, M. (2019). Preliminary evaluation of hepatoprotective and nephroprotective effects of *Prosopis ruscifolia* Griseb. leaves extract in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences* 9(12), 37–41. doi: 10.7324/JAPS.2019.91206
17. Velázquez, A., Diarte, E., Henichen, O., Montalbetti, Y., Campuzano-Bublitz, M., Kennedy, M., Hellión-Ibarrola, M. & Ibarrola, D. (2020). *Baccharis crispa* attenuates toxic hepatitis induced by acetaminophen and carbon tetrachloride in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 10(11), 110–116. doi: 10.7324/JAPS.2020.101115
18. Velázquez, A., Diarte, E., Galeano, A., Burgos-Edwards, A., Alvarenga, N., Heinichen, O., Montalbetti, Y., Campuzano-Bublitz, M., Kennedy, M., Hellión-Ibarrola, M. & Ibarrola, D. (2021). Hepatoprotective activity of *Dorstenia brasiliensis* against acute hepatitis induced by acetaminophen and carbon tetrachloride in mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 12, 6384–6392. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.12(12).6384-92
19. Cechinel-Zanchett, C., de Andrade, S. & Cechinel-Filho, V. (2018). Ethnopharmacological, Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Bauhinia forficata*: A Mini-Review Covering the Last Five Years. *Natural Product Communications* 13(7), 911–916. doi:10.1177/1934578X1801300732
20. Cechinel-Zanchett, C., Melo, R., Tenfen, A., Siebert, D., Micke, G., Vitali, G., Cechinel-Filho, V., Faloni, S. & de Souza, P. (2019). *Bauhinia forficata* link, a Brazilian medicinal plant traditionally used to treat cardiovascular disorders, exerts endothelium-dependent and independent vasorelaxation in thoracic aorta of normotensive and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 243, 112118. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112118>
21. Miceli, N., Buongiorno, L., Celi, M., Cacciola, F., Dugo, P., Donato, P., Mondello, L., Bonaccorsi, I. & Taviano, M. (2016). Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. *Natural product research*, 11, 1229–1239. doi: 10.1080/14786419.2015.1050671
22. Cechinel-Filho, V. (2009). Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research* 23(10), 1347–1354. <https://doi.org/10.1002/ptr.2756>
23. National Research Council (US). (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, United States. National Academies Press (US). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910
24. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, (2022). <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/15487898>
25. Dufour, D., Lott, J., Nolte, F., Gretch, D., Koff, R. & Seeff, L. (2000). Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry* 46(12), 2027–2049. doi.org/10.1093/clinchem/46.12.2027.
26. Strömme, J. & Eldjam, L. (1974). Scandinavian Standardizations of Enzyme Determination. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 33(4), 287–289. doi: 10.1080/00365517409082498
27. Randjelovic, P., Veljkovic, S., Stojiljkovic, N., Sokolovic, D., & Ilic, I. (2017). Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI journal*, 16, 388–399. <https://doi.org/10.17179/excli2017-165>.
28. Raju, S., Kavimani, S., Maheshwara Rao, V. U., Reddy, K. S., & Kumar, G. V. (2011). Floral extract of *Tecoma stans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity *in vivo*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(9), 680–685. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60173-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60173-9)
29. Rajamurugan, R., Suyavaran, A., Selvaganabathy, N., Ramamurthy, C., Reddy, G., Sujatha, V. & Thirunavukkarasu, C. (2012). *Brassica nigra* plays a remedy role in hepatic and renal damage. *Pharmaceutical Biology* 50(12), 1488–1497. doi: 10.3109/13880209.2012.685129
30. Abdel-Kader, M., Alanazi, M., Bin, A., Al-Saikhan, F. & Hamad, A. (2017). Hepatoprotective and nephroprotective activities of *Juniperus sabina* L aerial parts. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 5(1), 29–39.
31. McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2019). Animal models of drug-induced liver injury. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(5), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>
32. Ezejiofor, A., Orish, C. & Orisakwe, O. (2014). *Costus afer* ker gawl leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 8(4), 310–313. PMID: 25001137
33. Sonkar, N., Ganeshpurkar, A., Yadav, P., Dubey, S., Bansal, D., & Dubey, N. (2014). An experimental evaluation of nephroprotective potential of *Butea monosperma* extract in albino rats. *Indian journal of pharmacology*, 46(1), 109–112. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.125190>

34. Ahmad, Q. Z., Jahan, N., Ahmad, G., & Tajuddin (2012). Nephroprotective effect of Kabab chini (Piper cubeba) in gentamycin-induced nephrotoxicity. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 23(4), 773–781. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.98159>
35. Olagunju, J., Adeneye, A., Fagbohunka, B., Bisuga, N., Ketiku, A., Benebo, A., Olufowobi, O., Adeoye, A., Alimi, M. & Adeleke, A. (2009). Nephroprotective activities of the aqueous seed extract of *Carica papaya* Linn. in carbon tetrachloride induced renal injured Wistar rats: a dose- and time-dependent study. *Biology and Medicine* 1(1), 11-19.
36. Okokon, J. E., Nwafor, P. A., & Noah, K. (2011). Nephroprotective effect of Croton zambesicus root extract against gentimicin-induced kidney injury. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(12), 969–972. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60228-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60228-9)
37. Atherton, J. (2006). Regulation of fluid and electrolyte balance by the kidney. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 7(7), 227–233. <https://doi.org/10.1053/j.mpaic.2006.04.002>
38. Kaloyanides, G. J., & Pastoriza-Munoz, E. (1980). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney international*, 18(5), 571–582. <https://doi.org/10.1038/ki.1980.175>
39. Govindappa, P.K., Gautam, V., Tripathi, S.M., Sahni, Y.P., Raghavendra, H.L. (2019). Effect of *Withania somnifera* on gentamicin induced renal lesions in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 29, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.005>
40. Bodakhe, S. & Ram, A. (2007). Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 127(9), 1503–1507. doi: 10.1248/yakushi.127.1503
41. Silva, K. & Cechinel-Filho, V. (2002). Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, 3, 449-454. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300018>
42. Franco, R. R., Mota Alves, V. H., Ribeiro Zabisky, L. F., Justino, A. B., Martins, M. M., Saraiva, A. L., Goulart, L. R., & Espindola, F. S. (2020). Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 123, 109798. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>
43. Salgueiro, A. C., Folmer, V., da Silva, M. P., Mendez, A. S., Zemolin, A. P., Posser, T., Franco, J. L., Puntel, R. L., & Puntel, G. O. (2016). Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 8902954. <https://doi.org/10.1155/2016/8902954>
44. Toloza-Zambrano, P., Avello, M. & Fernandez, P. (2015). Determination of rutin and trigonelline in extracts of *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and hypoglycemic effect on diabetic and prediabetic patients humans. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe De Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14 (1), 21–32.