



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Cibelle Correia Cavalcante Lacerda

Avaliação da Atividade Radioprotetora de
Flavonoide Isolado de *Conocarpus erectus* Linneus
(Combretaceae) em Linfócitos Humanos Irradiados
in vitro

Recife

2017

Cibelle Correia Cavalcante Lacerda

Avaliação da Atividade Radioprotetora de Flavonoide Isolado de
Conocarpus erectus Linneus (Combretaceae) em
Linfócitos Humanos Irrradiados in vitro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira Co-orientador: Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes

Recife

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

L131a Lacerda, Cibelle Correia Cavalcante.
Avaliação da atividade radioprotetora de flavonóide isolado de canocarpus erectus linneus (combretaceae) em linfócitos humanos irradiados, in vitro / Cibelle Correia Cavalcante Lacerda. – Recife: o autor, 2017.
80 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde. Inclui referências.

1. Mangue.. 2. Polifenol. 3. Citotoxicidade. 4. Cromossomos. I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (orientador). II. Título.

610 CDD (23. ed.) UFPE (CCS 2018-166)

CIBELLE CORREIA CAVALCANTE LACERDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RADIOPROTETORA DE FLAVONÓIDE
ISOLADO DE CANOCARPUS ERECTUS LINNEUS (COMBRETACEAE)
EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS, IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do título de
MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovado em: 17/11/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Simone Cristina Soares Brandão (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr^º. Wolfgang Harand (Examinador Externo)
Instituto Nacional do Semiárido/INSA/PB

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Moutinho Lagos de Melo
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação aos meus pais e ao meu esposo por todo estímulo na busca de novos conhecimentos. E a todos que também tornaram este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua graça e misericórdia me concedeu a oportunidade e que com suas mãos me sustenta e me dá forças para continuar a caminhada. Por proteção e fidelidade.

Aos meus pais Helvio e Wilma, que com todo amor e dedicação cuidaram de mim e me ajudam a enfrentar as dificuldades desta vida, me incentivando a alcançar os meus objetivos.

Ao meu esposo Alex, pelo incentivo, pelos muitos momentos de ajuda e por trazer sempre carinho e conforto.

A minha Família, aos meus irmãos em Cristo e aos meus colegas Acadêmicos que me encorajaram e intercederam a Deus por mim, e também me ajudaram com seus conhecimentos e apoio moral, sempre presentes me dando força.

Ao Professor Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira, inicialmente pela amizade de longa data, que em muitos momentos me apoiou e não deixou que o cansaço e vontade de desistir tomasse conta das minhas decisões, por ter me acolhido nesta jornada acadêmica, com sabedoria, rigidez e imenso carinho, principalmente pelo seu companheirismo e paciência.

Ao Professor Dr. Thiago de Salazar e Fernandes pela co-orientação, colaboração e oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por todo conhecimento cedido e trabalhado. Por todo o empenho e dedicação, sempre me incentivando a buscar o melhor.

A Professora Dra. Mariana Brayner, a todas as portas e convênios que proporcionou para efetiva finalização deste estudo e a equipe do LAMBDA/DEN (UFPE) que me ajudou a trilhar certo o caminho do conhecimento.

Ao amigo Daniel Junior, fonte de aprendizado diário, por todo carinho e parceria durante o curso da minha pesquisa, sempre presente e disponível a ajudar, que levarei por toda vida.

Ao Dr. Wolfgang Harand e toda equipe do Instituto Nacional do Semiárido (INSA/PB) por todo auxílio e conhecimento acrescentado, pela diligência e apoio durante todo o processo de formação.

À todos que cederam ou autorizaram o uso de equipamentos e espaços científicos para o desenvolvimento do meu trabalho e pelos diversos esclarecimentos prestados.

À todos os professores e funcionários da Pós-Graduação em Ciências da Saúde que colaboraram para a minha formação profissional.

Ao Professor Dr. Brivaldo Markman, coordenador da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que não só participou da minha banca de seleção mas também me apoiou em momentos difíceis nesta caminhada, além da sua presteza e zelo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à concessão de bolsa de mestrado durante todo o período de pesquisa.

As colegas de estudo Vanessa e Dayane, aos meus amigos queridos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

Reconhece-o em todos os teus caminhos,
e Ele endireitará as tuas veredas.

Provérbios 3: 6

RESUMO

Plantas do manguezal possuem importantes substâncias bioativas, que apresentam efeito radioprotetor. Uma importante espécie é o *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae) apresenta em sua composição, flavonoides, um grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis que possuem propriedades antioxidantes. Até o final do século XIX, a ação desses compostos era vista como irrelevante, pois os danos da radiação não eram bem conhecidos. As radiações ionizantes interagem com a célula podendo causar danos ao DNA, originando alterações que podem levar até a sua morte. A radioatividade e as radiações ionizantes fazem parte do meio ambiente, no entanto, não são percebidas naturalmente pelos órgãos dos sentidos do ser humano, diferindo-se da luz visível e do calor. Este estudo isolou o flavonoide majoritário do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* (EAFCe), e investigou sua atividade citotóxica e explorou a possível ação radioprotetora em linfócitos humanos expostos à radiação gama. Inicialmente, a coleta do material vegetal foi realizada no manguezal do município de Itamaracá/PE (distrito de Vila Velha). O EAFCe foi preparado por infusão em água destilada (40° C por 30 min), liofilizado e armazenado em temperatura ambiente. A análise fitoquímica do EAFCe foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Na purificação e isolamento do flavonoide do EAFCe foi utilizada a CLAE preparativa, com detecção por luz ultra violeta (UV) e espectrometria de massa. Para avaliação da citotoxicidade e análise de micronúcleo, células mononucleares de sangue periférico humano foram obtidas a partir de 4 mL de sangue de 4 voluntários e associadas a flavonoide isolado do EAFCe, em concentrações de 1, 10, 50 e 100 µg/mL, pelo teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O potencial efeito radioprotetor do flavonoide isolado de EAFCe, em concentrações de 1 e 0,5 µg/mL, foi determinado através da análise microscópica de linfócitos humanos (in vitro) expostos à radiação gama com dose de 3 gray (Gy) proveniente de um fonte de cobalto-60 (Gammacell 220 Excel) de alta taxa de dose (2,181 kGy/h). Foram contabilizados micronúcleos no total de 300 células para cada grupo (irradiado e controle). A análise estatística do efeito radioprotetor foi realizada através do teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson com valor de $p \leq 0,05$. A pesquisa fitoquímica do EAFCe mostrou a presença de flavonoides. Na análise da citotoxicidade, 98% dos linfócitos humanos não apresentaram morte celular após o tratamento com o flavonoide isolado do EAFCe, mostrando resultado estatístico significativo na concentração ideal de 1 µg/mL. A ocorrência de flavonoides em plantas é difundido através das análises de ressonância magnética e ¹³C. Neste trabalho, os estudos de RMN de vários sinais são relatados pela atribuição completa de próton e carbono, por uma análise espectral detalhada. Os resultados referentes ao potencial efeito radioprotetor mostraram que a presença de micronúcleos em linfócitos irradiados e não irradiados, tratados com o flavonoide isolado de EAFCe na concentração de 1,0 µg/mL ($p \leq 0,05$), foram de 5,7% e 2,7%, respectivamente, sendo estes percentuais quando comparados aos demais grupos (controle, doxorribicina e demais concentrações do composto). A partir dos resultados desta pesquisa, o flavonoide isolado do extrato aquoso de *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae), na concentração de 1,0 µg/mL, demonstra potencial como um radioprotetor natural, não demonstrando toxicidade celular, podendo vir a ser utilizado nas áreas médica e farmacêutica.

Palavras-chave: Mangue. Polifenol. Radiação. Citotoxicidade. Cromossomos.

ABSTRACT

Mangrove plants have important bioactive substances, which present radioprotective effect. An important specie is *Conocarpus erectus* L. (Combretaceae), which has in its biochemical composition flavonoids, a group of secondary metabolites of the class of polyphenols that have antioxidant properties. Until the late nineteenth century, the action of these compounds was seen as irrelevant because the radiation damage was not well known. The ionizing radiation interacts with the cell and can cause damage to the DNA, causing changes that can lead to cell death. Radioactivity and ionizing radiation are part of the environment, but it is not perceived naturally by the sense organs of human beings, differing from visible light and heat. This study (in vitro) isolated the major flavonoid from the aqueous extract of *C. erectus* leaves (EAFCe), also investigated the cytotoxic activity and explored radioprotective action in human lymphocytes exposed to gamma radiation. Initially, the collection of the vegetal material was carried out in the mangrove of the municipality of Itamaracá / PE (district of Vila Velha). EAFCe was prepared by infusion in distilled water (400 for 30 min), lyophilized and stored at room temperature. The phytochemical profile of EAFCe was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) by qualitative tests under an analytical system. In the purification and isolation of the CFFCe flavonoid, the HPLC was used under preparative system, monitored by Ultra Violet (UV) and mass spectrometry. For evaluation of cytotoxicity and micronucleus analysis, human peripheral blood mononuclear cells were obtained from 4 mL of blood of 4 volunteers. The analysis of the cytotoxic activity of flavonoid isolated from EAFCe at concentrations of 1, 10, 50 and 100 µg / mL was performed by the MTT test (3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5-diphenyl bromide tetrazoline), previously counting viable cells by Tripán Blue. The potential radioprotective effect of flavonoid isolated from EAFCe at concentrations of 1 and 0.5 µg / mL was determined by microscopic analysis of human lymphocytes (in vitro) exposed to the dose of 3 gray (Gy) of gamma rays from a radiation source of cobalt-60 (Gammacell 220 Excel) with high dose rate (2,181 kGy/h). Micronuclei were counted in a total of 300 cells from each group (irradiated and control). Statistical analysis of the radioprotective effect was performed using the Pearson chi-square statistical test with a value of $p \leq 0.05$. The phytochemical profile of EAFCe showed the presence of flavonoids. In the cytotoxicity analysis, 98% of the human lymphocytes did not present cell death after the treatment with the flavonoid isolated from the EAFCe, showing a statistically significant result in the ideal concentration of 1 µg / mL. The occurrence of flavonoids in plants is diffused through magnetic resonance and ^{13}C analyzes. In this work, NMR studies of various signals are reported by complete assignment of proton and carbon by detailed spectral analysis. The results of the potential radioprotective effect showed that the presence of micronuclei in irradiated and non-irradiated lymphocytes treated with the flavonoid isolated from EAFCe at the concentration of 1.0 µg / mL ($p \leq 0.05$) was 5.7% and 2.7%, respectively, and these percentages were compared to the other groups (control, doxorribicin and other compound concentrations). From the results of this research, the flavonoid isolated from the aqueous extract of *C. erectus* L. (Combretaceae), at a concentration of 1.0 µg / mL, may be a therapeutic medium as a natural radioprotector, not demonstrating cellular toxicity, and may be used in the areas of medicine and pharmacy.

Keywords: Mangue. Polyphenol. Radiation. Cytotoxicity. Chromosomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Imagem de satélite do local de coleta da planta (7° 40' latitude sul e 34° 50' longitude oeste). Fonte: Google Maps, data: 10/07/2017 47
- Figura 2 - Exemplos de *Conocarpus erectus* coletados e utilizados nesta pesquisa. Fonte: próprio autor.....48
- Figura 3 - Cromatograma dos principais compostos identificados no EAFCe (256nm) e Análise do cromatograma do principal pico da fração do extrato aquoso de *C. erectus*.....69

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1: representação do numero de células relacionados aos grupos de estudo respectivamente	61
Gráfico 2: representação do numero de células relacionados aos grupos de estudo respectivamente	63
Tabela 1 - Detalhamento das variáveis dependentes e independentes da pesquisa	45
Tabela 2 - Avaliação da presença de micronúcleo segundo os grupos entre as amostras irradiadas	77
Tabela 3 - Avaliação da presença de micronúcleo segundo o grupo entre as amostras não irradiada	78
Tabela 4 - Avaliação da presença de micronúcleo entre as amostras irradiadas e não irradiadas por grupo	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPC	Cromatograma de Pico de Base.
CCD	Cromatografia de Camada Delgada.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
CPRH	Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos.
CtB	Citocalasina B.
DEN	Departamento de Energia Nuclear.
EAFCe	Extrato Aquoso de Folhas de <i>Conocarpus erectus</i> .
Gy	Gray.
IC	Concentração Máxima Inibitória.
INSA/PB	Instituto Nacional do Semiárido/Paraíba.
LabCen	Laboratório Central.
LAMBDA	Laboratório de Modelagem e Biodosimetria aplicada.
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas.
LPTIT	Laboratório de Pesquisa Translacional e Inovação Terapêutica.
MN	Micronúcleo.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico.
PBS	Phosphate Buffered Saline.
PHA	Fito hemaglutinina.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute.
SBF	Soro Bovino Fetal.
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio.
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences.
SUS	Sistema Único de Saúde.
UV	Ultra Violeta.
WR	Walter-Reed.
NK	Natural Killer.
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).
ROS	Oxigênio reativo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HISTÓRICO	18
2.2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.2.1. PLANTAS MEDICINAIS.....	20
2.2.1.1. FITOTERÁPICOS	20
2.2.1.2. Conocarpus erectus.....	23
2.2.1.3. FLAVONÓIDES.....	25
2.2.1.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
2.2.2. RADIOPROTEÇÃO.....	30
2.2.2.1. RADIAÇÃO	30
2.2.2.2. EFEITOS BIOLÓGICOS RADIOINDUZIDOS	32
2.2.2.3. MICRONÚCLEOS	35
2.2.2.4. ATIVIDADE RADIOPROTETORA	37
2.3. JUSTIFICATIVA	39
3.4. OBJETIVOS	40
3.4.1 OBJETIVO GERAL	40
3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.5. MATERIAIS E METODOS	41
3.5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	41
3.5.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	41
3.5.3. OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	41
3.5.3.1. ETAPA BOTÂNICA.....	41
3.5.3.1.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	41
3.5.3.1.2. EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE Conocarpus erectus L	42
3.5.3.1.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EAF _{Ce}	43
3.5.3.1.4. PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE FLAVÓNOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EAF _{Ce}	43
3.5.3.2. ETAPA BIOLÓGICA	44
3.5.3.2.1. ASPECTOS ÉTICOS	44
3.5.3.2.2. CASUÍSTICA: Critérios de inclusão e exclusão.....	44
3.5.3.2.3. DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS	44

3.5.3.2.4. COLETA DE AMOSTRAS SANGÜÍNEAS.....	45
3.5.3.2.5. PROCESSO DE IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS, ESPECÍFICAS DAS CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO E DOSES ADMINISTRADAS	45
3.5.3.2.6. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs).....	45
3.5.3.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE	45
3.5.3.4. TESTE DE GENOTOXICIDADES	46
3.5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDE DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE C.ERECTUS ATRAVÉS DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	50
6.2. ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR, ANÁLISE DOS MICRONUCLEOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RADIOPROTECTORA DE FLAVONÓIDES	60
6.3. ESPECTRO DO FLAVONÓIDE MAJORITÁRIO	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Radiações fazem parte do nosso dia a dia, podendo ser de origem de fontes naturais (e.g., raios gama) ou artificiais (e.g., raios-X). Apesar de alterações moleculares serem produzidas por esta fonte de energia, a vida se adaptou a estas condições, por meio de mecanismos de reparação celular. Além disso, os efeitos adversos mudam em função da dose e do tempo de exposição (BROOKS et al., 2016; UNSCEAR, 2011; SEGRETO, 2000).

A radiação promove quebra de moléculas que resultam na liberação de radicais livres e, conseqüentemente, levam à geração de compostos que alteram moléculas. O interesse em compostos com propriedades antioxidantes surge por estes terem a capacidade de neutralizar estas espécies reativas, promovendo com isso uma ação radioprotetora (radioprotetores). Muitos destes compostos são encontrados na natureza e até mesmo nos alimentos, e o interesse pelo seu uso vem aumentando à medida que o uso das radiações ionizantes vem se expandindo na indústria, na medicina e em pesquisas científicas (PONTUAL et al., 2004; LEE et al., 2005; RAJAGOPALAN et al., 2002).

As substâncias que neutralizam quimicamente os radicais livres produzidos pela interação da radiação ionizante com o tecido vivo reduzem ou até mesmo anulam os danos biológicos radioinduzidos (KOUKOURAKIS, 2012).

Existem radioprotetores sintéticos e naturais, sendo os naturais uma alternativa interessante por possuírem toxicidade menor e já serem comumente consumidos por populações humanas, quando comparados aos sintéticos. O mecanismo de ação de substâncias naturais seria exatamente o mesmo que o produzido por compostos sintéticos, ou seja, teriam capacidade de ligação com os produtos gerados pela radiação, com a vantagem de serem menos tóxicos, ou até atóxicos (JAGETIA; BALIGA, 2000; RASOANAIVO et al., 2011).

Historicamente, extratos vegetais são usados de forma segura e eficaz, por serem conhecidas e transmitidas ao longo de gerações, informações a respeito de seus benefícios à saúde e qualidade de vida humana. Tal conhecimento sobre os potenciais terapêuticos das plantas têm despertado novos caminhos para a ciência moderna (UPADHYAY et al., 2014).

O uso de produtos fitoquímicos e extratos de plantas também inclui a presença dos metabólitos secundários como agentes que podem vir a atuar nos efeitos terapêuticos, e este tem sido um tópico de pesquisa cada vez mais atrativo, o que aumenta o interesse em sua pesquisa. Diversos compostos naturais são analisados quanto à presença de moléculas que podem desempenhar funções antioxidantes e, deste modo, ação radioprotetora (ABREU et al., 2012)

Conocarpus erectus L., espécie pertencente à família Combretaceae, possui propriedades terapêuticas já comprovadas, e é bastante utilizada na medicina popular, principalmente sob a forma de chá, na prevenção e tratamento de enfermidades, sendo conhecida como mangue de botão. Cresce sobre linhas costeiras nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Pesquisas confirmam a presença de metabólitos secundários, por exemplo os flavonóides, em suas folhas, caules, frutos e flores (ABDEL-HAMEED et al, 2013; BANDEIRA, 2003). Estudos mostram que um dos principais efeitos induzidos pelos flavonóides é a ação antioxidante (ALCARAZ; CARVALHO, 2004; BEHLING et al., 2004).

A presente pesquisa foi desenvolvida com a finalidade de isolar o flavonoide majoritário do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* (EAFCe), confirmar seu espectro por RMN, investigar sua atividade citotóxica e explorar a ação radioprotetora em linfócitos humanos expostos à radiação gama.

2. HISTÓRICO

Conocarpus erectus L., planta encontrada no manguezal (um dos indicadores ecológicos mais significativos na zona costeira), é uma espécie utilizada popularmente no tratamento de diversas enfermidades, como: anemia, gonorréia, diabetes, diarreia, febre, dor de cabeça e sífilis (SHOHAYEB et al.), 2013).

Ecossistemas estão associados a bioma, sendo a mata atlântica um exemplo que fornece aos recursos hídricos, estudos científicos a cerca das propriedades farmacológicas do *C. erectus* comprovam suas propriedades antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica e hepatoprotetora (RAZA et al., 2016; ABDEL-HAMEED et al., 2014).

A valorização da utilização das plantas medicinais tem sido estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978. O Ministério da Saúde implementou em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e inseriu as plantas medicinais através da fitoterapia, acupuntura, entre outras terapias complementares (BRASIL, 2014).

A busca por substâncias naturais que apresentem elevada ação antioxidante e que consequentemente possibilitem a substituição dos radioprotetores sintéticos ou associações com eles, estimula as pesquisas atuais. O uso de medicamentos à base de plantas e suplementos aumentou ao longo das últimas três décadas (EKOR, 2013).

Plantas medicinais são espécies vegetais utilizadas na área da medicina complementar e produção de bioativos, como substitutos terapêuticos, com a finalidade de prevenir e tratar doenças ou de aliviar sinais e sintomas das mesmas (KITTS et al., 2000 a,b).

O seu potencial antioxidante apresenta-se de forma elevada, principalmente pelos seus flavonóides, o que os considera espécies reativas do oxigênio de grande reatividade e relacionadas com o desencadeamento da peroxidação lipídica, especificamente o superóxido e hidroxila (GAVELOVÁ et al., 2008).

O desenvolvimento de radioprotetores eficazes e menos tóxicos tem estimulado o estudo com compostos de origem natural. Os antioxidantes que possuem a capacidade de interagir e neutralizar os radicais livres oriundos do efeito das radiações ionizantes (RIs) são conhecidos como radioprotetores (LEE et al., 2010).

Os radioprotetores sintéticos apresentam um potencial efeito protetor frente às RIs, pois são capazes de inativar as espécies reativas de oxigênio presente no interior das células. No entanto, na prática clínica, seu uso é limitado devido aos seus efeitos colaterais

indesejáveis (como náusea, tontura, vômito) e alta toxicidade (KONOPACKA; RZESZOWKA WOLNY, 2001).

A resposta celular à radiação ionizante se apresenta sob uma variedade de espécies químicas reativas (oxigênio reativo intracelular), chamados de radicais livres, os quais podem, por exemplo, interferir na função celular. Os efeitos biológicos das radiações aumentam proporcionalmente com a dose absorvida de radiação, ou seja, doses baixas produzem pouco ou nenhum dano, e com o aumento da dose, o aumento dos efeitos ocorre de forma proporcional. Com isso, no diagnóstico por imagem, em geral as doses são menores e não produzem efeitos, enquanto que na radioterapia a dose é elevada para destruição do tecido tumoral (MEHER et al., 2017; ZHOU et al., 2014).

As RIs podem induzir modificações estruturais nas biomoléculas, a depender da interação com a matéria viva, da dose, distribuição e absorção da energia, bem como do tempo de exposição. Na atualidade, existem atividades profissionais, como da área médica e odontológica, que utilizam equipamentos emissores de radiação para identificar, localizar e tratar doenças (FARAH et al., 2013; UNSCEAR, 2011).

Sendo assim, esta pesquisa foi desenvolvida com a hipótese de que o flavonoide majoritário isolado de *Conocarpus erectus*, por se tratar de um composto natural, não devem apresentar propriedades citotóxicas e possivelmente possuem ação radioprotetora.

2.2. REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1. PLANTAS MEDICINAIS

2.2.1.1. FITOTERÁPICOS

Os sistemas tradicionais e complementares de medicina abrangem uma ampla gama de práticas que são comumente incorporadas no meio cultural contextual, refletindo as crenças, experiências, religião e espiritualidade da comunidade. A medicina tradicional ou não-convencional é a soma total dessas habilidades, conhecimentos e práticas construídas e conservadas e relacionadas ao uso de plantas medicinais desenvolvidas através do contato social diário. Esses conhecimentos empíricos sobre a flora medicinal são passados de geração a geração.

Os primeiros registros do uso da medicina tradicional, escritos em tábuas de argila, são da Mesopotâmia e datam cerca de 2.600 a.C.. As plantas formaram a base de sistemas de medicina tradicional sofisticada os quais ainda hoje são usados para o tratamento, como por exemplo, de tosse, resfriados, infecções, inflamações, analgesia, dentre outros. A ciência da etnobotânica e da etnofarmacognosia, usada como guia em diferentes fontes e classes de compostos, ressalta o fato da flora dos trópicos, em virtude de sua diversidade, ter um papel importante a desempenhar, dando direcionamento aos testes científicos (GURIB-FAKIM, 2006; BENKOVIĆ et al, 2008b).

Estudos têm sido conduzidos, no Brasil, buscando organizar os conhecimentos da medicina popular com atividade terapêutica efetiva e possibilidades de descoberta de novos fármacos. Neste contexto, damos importante destaque às plantas, por ser possível, a partir delas, produzir novos medicamentos, por meio da extração de seus princípios ativos, tal como seus compostos secundários, e estudar assim os modelos químicos de tais moléculas. Porém, o uso de produtos naturais como medicamentos representa um grande desafio (BARROS et al., 2000; PENIDO et al., 2016).

Há necessidade de projetos que busquem investigar e informar a população sobre o uso correto das plantas medicinais, à base de pesquisas para comprovar suas atividades farmacológicas e descrever as suas propriedades curativas e toxicológicas (ABDEL- HAMEED et al., 2012; CRUZ, 2008).

Existem espécies de plantas importantes, úteis para a descoberta de novos compostos essenciais para uso medicinal, dentre elas as propriedades antioxidantes desses produtos, que estão associadas ao efeito radioprotetor (OLIVEIRA et al. 2010; AYOUB, 2010).

A Organização Mundial de Saúde revela que 85% das pessoas do mundo utilizam plantas medicinais para tratar doenças. O Brasil possui a maior diversidade de plantas do planeta, com cerca de 200 mil espécies, distribuídas em diferentes ecossistemas, além de uma extraordinária diversidade cultural, refletindo em diferentes formas de utilização terapêutica dos recursos naturais. Como exemplo de regiões com influência cultural e diversidade de plantas, temos no Nordeste brasileiro essa prática (TEIXEIRA et al., 2014).

Elevada taxa de uso das plantas medicinais aumentou a perspectiva do uso racional e seguro destas, sendo reforçado pelo elevado índice de desconhecimento acerca de suas contraindicações. A validação ética das plantas medicinais como medicamentos seguros, não pode basear-se em crenças, mitos, lendas e tradições. O desconhecimento, do real efeito, de produtos naturais pode comprometer a saúde do usuário, em diferentes níveis de gravidade (FREIRE et al., 2015).

Devido à importância das plantas medicinais para a química e a medicina moderna, estudos permitiram que muitas das suas substâncias ativas fossem conhecidas e introduzidas na terapêutica, através da combinação de micronutrientes, antioxidantes, substâncias fitoquímicas e fibras (CUNHA et al., 2016).

Os manguezais são exemplos de florestas existentes no litoral brasileiro, que possui uma ampla diversidade de espécies vegetais, que atraem a atenção para os possíveis estudos de interações medicamentosas de produtos naturais consumidos pela população, e para o desenvolvimento de novos medicamentos (NICOLETTI et al., 2010; MARTINS; GARLET, 2016).

As plantas em manguezais possuem boa adaptação, ecológica e fisiológica, às condições adversas do meio ambiente, e crescem na interface entre terra e mar em latitudes tropicais e subtropicais, e ambiente com altos níveis de sal favorecem sua vegetação. Além disso, apresentam, numa análise fitoquímica, compostos fenólicos, que podem ser desde moléculas simples, até algumas com elevado grau de polimerização, como os flavonóides, os quais desempenham ação antioxidante (KANDASAMY; BINGHAM R. L., 2001).

A influência desses compostos naturais sobre a biodisponibilidade de produtos gerados pela interação das RI com o tecido vivo, se dá por meio de uma vasta gama de metabólitos secundários, tanto de amostras provenientes de fontes terrestres quanto marinhas, que vêm

sendo cada vez mais investigadas quanto ao seu possível emprego farmacêutico (DIAS et al., 2012; BERNARDO-FILHO et al., 2005).

A produção de informações confiáveis sobre a atividade farmacológica de novas entidades químicas extraídas das plantas é essencial nos estágios iniciais da pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novas drogas. Existe uma necessidade contínua de melhoria das tecnologias existentes, a fim de obter mais precisão e mais dados biológicos. A produção de metabólitos secundários pela planta ocorre em função da interação planta e meio ambiente, em resposta a fatores químicos e biológicos (SILVA;LIMA,2016;ZANG et al.,2016).

Propriedades farmacológicas das plantas dependem dos seus compostos secundários. Tais metabólitos, presentes na forma ativa, proporciona a saúde da planta por interagir com os ecossistemas, mantendo a integridade contra competidores, predadores e patógenos, aumentam a probabilidade de sobrevivência da respectiva espécie, sendo responsáveis por diversas atividades biológicas para proteger as plantas, podendo-se incluir a atividade radioprotetora (ZHENG et al.,2016).

Uma vez que a população brasileira faz uso de diversos tipos de chás, e que estes podem vir a interferir na biodistribuição de fármacos, inclusive radiofármacos utilizados para diagnósticos em Medicina Nuclear, é necessário se investigar propriedades radiomodificadoras de plantas, no intuito de evitar erros diagnósticos ou interferências em tratamentos radioterápicos. Além disso, até o momento não uma droga candidata ideal que possa proteger os tecidos sadios dos efeitos indesejados das RIs, apesar de já terem sido descritos inúmeros compostos naturais que possuem propriedades antioxidantes que viriam a neutralizar os radicais livres produzidos pela interação da radiação ionizante (KOIDE et al., 2011; SALEEM; NASEER,2014).

Várias plantas têm sido usadas para tratar doenças relacionadas aos radicais livres por conter componentes bioativos, com atividades farmacológicas que podem, de diferentes formas, contribuir para a recuperação dos danos provocados pela radiação, através de efeitos antiinflamatórios, antioxidantes, antieméticos, proliferativo sobre as células, estimulador hematopoiético ou cicatrizante. A pesquisa com plantas pode prover novas fontes de drogas potencialmente radioprotetoras (ARORA et al., 2005).

A atividade antioxidante dos polifenóis, decorrente de interações ou de processos fisiológicos e patológicos na biologia celular das plantas e de seus compostos, depende da especificidade de importantes mecanismos de sinalização que são ativados pela associação entre os fatores de crescimento, seus receptores e seus ligamentos específicos da matriz

extracelular. Na medicina tradicional, um grande número de evidências demonstra a importância da coordenação de sinais a partir do ambiente extracelular, que ativa receptores específicos para regular processos vitais (PERRON; BRUMAGHIM, 2009).

2.2.1.2. *Conocarpus erectus*

A estrutura do mangue, como a de qualquer bioma, é o resultado de interações entre as respostas das espécies aos fatores de estresse abiótico, perturbação, dispersão e competição. Mesmo em florestas com apenas algumas espécies, este conjunto de fatores pode criar composições de espécies múltiplas. É uma vegetação que funciona como uma eficiente proteção das margens das desembocaduras fluviais, diminuindo a erosão, retraindo o avanço das dunas, além de assumir um papel fundamental na proteção de inúmeras espécies de moluscos, crustáceos, peixes e aves (BERGER et al., 2006).

Os manguezais em destaque ocupam uma área estimada de 181.000 km², que compreendem 43% das linhas costeiras das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Estas florestas de mangue são compostas basicamente por quatro gêneros: *Avicennia* (Avicenniaceae), *Laguncularia* (Combretaceae) e *Rhizophora* (Rhizophoraceae), *Conocarpus* (Combretaceae) (GIRI; MUHLHAUSEN, 2008; MENEZES et al., 2008).

Conocarpus erectus L. (família Combretaceae) é uma árvore perene de até seis metros de altura com casca cinzenta ou castanha, coroa de espalhamento, folhas verdes e flores esverdeadas, semelhantes a cones. É capaz de tolerar o calor extremo do deserto, onde as temperaturas do verão podem alcançar 47°C, e crescer em solo de fertilidade muito baixa. A capacidade do solo para reter água com o aumento das concentrações de hidrogel. Com crescimento razoavelmente rápido, ela pode sobreviver aos níveis elevados de salinidade. É plantada extensamente como uma planta ornamental e cultivada como bonsai (AL-HUMAID; MOFTAH, 2014).

Encontrada em uma larga faixa do litoral meridional, na América do Sul, do Equador até o Brasil e nas áreas litorâneas da África Ocidental. No Brasil foi registrada nas áreas litorâneas do Pará até o litoral norte do Paraná. Constatou-se a ocorrência de nove espécies distribuídas em cinco gêneros. No estado de Pernambuco existe área de reserva, no manguezal da cidade de Itamaracá, distrito de Vila Velha (MONTONO et al., 2011).

Portanto, esta planta serve de fonte de novos agentes terapêuticos e aplicações versáteis na medicina popular. Estudos demonstraram alta atividade antioxidante, que é atribuída à presença de compostos fenólicos. A busca incessante por obter uma resposta

terapêutica aos danos radioinduzidos, é ainda mais reforçada quando se trata de compostos naturais (MARCU, 2009; ABDEL-HAMEED et al., 2012).

A visão farmacológica com base em produtos naturais vem sendo ampliada nos últimos anos, principalmente com a descoberta de novos metabólitos. Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais encontrados no reino vegetal e mais utilizados nas pesquisas que buscam alternativas para impedir ou reverter alterações cromossômicas. Dentre estes, pode-se citar os flavonóides, classe de metabólitos secundários presentes em várias frutas e vegetais (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012; GLASER, 2003; SPAGNUOLO et al., 2012)

Os metabólitos secundários, em sua maioria, originam-se a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais (ácido chiquímico e acetato), cuja diversidade estrutural se deve às modificações na cadeia carbônica principal de sua estrutura.

Conhecida pela humanidade desde o homem primitivo, as plantas são usadas para a alimentação e para curar doenças. É evidente que uma dieta com nutrientes essenciais e substâncias bioativas desempenha um papel importante na prevenção e cura de doenças crônicas. Estudos possibilitaram o isolamento deste composto das folhas de *Conocarpus erectus* L., os quais mostraram efeito inibitório contra espécies reativas de oxigênio (AYOUB, 2010).

A diversidade estrutural dos metabólitos secundários, em sua maioria, é gerada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura. Esses compostos possuem uma variedade de funções biológicas. Os radicais livres são produzidos durante o metabolismo oxidativo em organismos vivos ou sob condições de estresse, como aumento de temperatura, exposição à radiação e ataques de patógenos (CAMPO, 2006).

O mecanismo protetor é capaz de neutralizar as reações produzidas por radicais livres, convertendo-os à moléculas menos nocivas. Como resultado, os antioxidantes atuam reparando eficazmente o dano oxidativo nas células. Moléculas antioxidantes naturais de fitoquímicos de origem vegetal podem inibir diretamente a produção ou limitar a propagação de radicais livres, ou até eliminá-los do sistema. A vantagem dos antioxidantes naturais estaria no fato destes possuírem em geral um menor efeito citotóxico. Os compostos biologicamente ativos, especialmente os fenólicos, são responsáveis pelo risco reduzido de desenvolver doenças crônicas (doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, etc.) devido à sua atividade antioxidante (DRAGOVIC-UZELAC et al., 2007).

Os flavonóides são conhecidos por exibirem propriedades farmacológicas como antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica. Na medicina

tradicional, utilizam-se plantas inteiras ou misturas de plantas em vez de compostos isolados. Há evidências de que os extratos brutos de plantas geralmente possuem maior atividade antiplasmodial (SHAH et al., 2014; RASOANAIVO et al., 2011; MOUKETTE et al., 2015).

As propriedades farmacológicas das plantas dependem dos seus compostos secundários, podendo ser classificados em três principais famílias: fenólicos, terpenos/esteróides e alcalóides. Estes aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas, além de, no caso dos compostos fenólicos, protegerem as plantas contra os raios ultravioletas, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU et al., 2000; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

2.2.1.3. FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos polifenólicos encontrados no reino vegetal. Apresentam um esqueleto, dividido em três unidades, A, B e C, sendo a 'C' um heterociclo contendo oxigênio, cujo estado de oxidação e nível de saturação define subclasses principais. As unidades 'A' e 'B' são anéis aromáticos, nos quais quatro tipos principais de substituintes, isto é, hidroxilo, metoxilo, prenilo e glicósidos, conduzem a mais de 8000 flavonóides diferentes (ERIC et al., 2013).

Os grupos hidroxila dos flavonóides estão normalmente presentes nos anéis A e B. A atividade antioxidante parece estar diretamente relacionada com o número destes, no núcleo B. O conhecimento de tais estruturas torna cada vez mais viável a otimização da biossíntese de produtos naturais (HALBWIRTH, 2010).

Os flavonóides possuem múltiplos efeitos biológicos, podendo assim desempenhar atividades radioprotetora. Na taxonomia, distinguem-se as espécies estreitamente relacionadas e protegem as plantas contra os efeitos danosos da radiação ultravioleta (CHABARIBERI et al., 2008; ARAÚJO, 2008). As plantas possuem uma capacidade inata de biossintetizar uma ampla gama de antioxidantes não enzimáticos capazes de atenuar os danos oxidativos induzidos pela radiação. As principais ações biológicas incluem propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias, que estão estritamente ligadas às atividades antioxidantes. A caracterização do comportamento redox leva a uma melhor compreensão das relações estruturais da atividade antioxidante. Considerando a baixa toxicidade dos flavonóides, destacamos o potencial do seu uso (SPAGNUOLO et al., 2012).

A suplementação de antioxidantes exógenos ou o reforço das defesas antioxidantes endógenas do corpo é uma forma promissora de combater os efeitos indesejáveis de danos

oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio, pois, o estresse oxidativo foi identificado como a causa de desenvolvimento e progressão de diversas doenças. O uso de antioxidantes tópicos pode contribuir para controlar o excesso de radicais livres produzidos pela irradiação ultravioleta. Alguns extratos de plantas, particularmente por causa de seus constituintes polifenólicos, podem ser benéficos para danos como estes (MORQUIO et al., 2005).

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo a longo prazo de chás e dietas ricas em polifenóis vegetais proporciona proteção contra o desenvolvimento de cânceres, doenças cardiovasculares e do sistema hepático e renal, diabetes, osteoporose e doenças neurodegenerativas (KASOTE et al., 2015; PANDEY; RIZVI, 2009).

Os compostos fenólicos da planta, como flavonóides, são reconhecidos como antioxidantes benéficos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde valorizam e estimulam a utilização das plantas medicinais (BRASIL, 2006). As ações antioxidantes e pró-oxidantes de fenólicos, em células vegetais (fitofenóis), podem atuar como antioxidantes doando elétrons a peroxidases para a destoxificação. Os radicais fenólicos, como resultado de reações antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas são formados como produtos oxidados primários (SAKIHAMA et al., 2002).

Estes compostos são capazes de destruir direta e indiretamente os radicais livres e assim, atuar nos organismos vivos como antioxidantes. Esta parece ser uma resposta biológica que pode proteger as células da oxidação. Pesquisas na busca de biomoléculas com atividade antioxidante, capaz de atuar na redução de danos moleculares causados pelos radicais livres e reagentes de oxigênio associados, crescem a cada dia (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O dano genético, a falha das defesas antioxidantes endógenas, o mau funcionamento hormonal, a permeabilidade da membrana alterada, a desregulação metabólica, a ruptura da capacidade de amortecimento do cálcio e o envelhecimento foram causas da disfunção mitocondrial. A ação protetora sistêmica decorrente dos polifenóis naturais reduz os efeitos colaterais negativos de vários fármacos, cujos efeitos indesejáveis podem ser combatidos pelos antioxidantes exógenos (suplementação) e endógenos (reforço de defesas), um método promissor (KASOTE et al., 2013).

Os produtos naturais e seus compostos derivados desempenham um papel importante nos cuidados à saúde modernos. A engenharia metabólica tem grande importância para gerar novos compostos biossintéticos. A maior parte da diversidade estrutural dos metabólitos secundários é gerada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura. Essas

modificações podem alterar a atividade biológica do composto derivado em relação à estrutura inicial (PICKENS et al., 2011).

O interesse na pesquisa sobre flavonóides de fontes de plantas cresce por causa dos benefícios à saúde, uma vez que estão diretamente associados à relação entre estrutura e função. A biodisponibilidade, o metabolismo e a atividade biológica dessas substâncias dependem da configuração, do número total de grupos hidroxila e da substituição de grupos funcionais na sua estrutura nuclear (KUMAR; PANDEY, 2013).

Estudos epidemiológicos revelam que grande parte da atividade dos flavonóides parece afetar o sangue e as células endoteliais microvasculares. Embora os flavonóides sejam estudados há 50 anos, os mecanismos celulares da sua ação biológica ainda não são completamente conhecidos. Muitas das suas propriedades farmacológicas podem estar ligadas a capacidade de inibir enzimas envolvidas na ativação celular (CASTILLO; BENAVENTE, 2008).

Plantas possuem a capacidade de produzir um número enorme de metabólitos fenólicos de importância vital para a interação com o ambiente, para a estratégia reprodutiva e mecanismos de defesa. A eliminação eficaz de radicais reativos e a baixa reatividade dos radicais antioxidantes secundários são dois requisitos críticos para um antioxidante e suas atividades biológicas (CHEYNIER et al., 2013).

Classificados de acordo com as suas estruturas químicas, as maiores classes de flavonóides incluem: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas. Esses compostos são distribuídos largamente nas folhas, sementes, raízes e flores das plantas. Muitas das ações biológicas dos flavonóides têm sido atribuídas a sua capacidade de redução ou doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular (MODRIANSKY et al., 2002).

Nas plantas, os flavonóides podem ter a função de absorver a radiação UV prejudicial que pode induzir um dano celular. Os antioxidantes são potentes catadores e eliminadores de radicais livres, os quais têm sido implicados em mais de uma centena de doenças nos seres humanos, incluindo artrite, processos neoplásicos, choque hemorrágico, aterosclerose, idade avançada, isquemia e lesão de reperfusão de muitos órgãos, doença de Alzheimer e Parkinson, entre outras (BAGCHI et al., 2000).

A literatura mostra que grande número de antioxidantes sintéticos e naturais induzem a efeitos benéficos na saúde humana e na prevenção de doenças. No entanto, a relação estrutura-atividade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica diferem extensivamente. Aqueles

de ocorrência natural, largamente disponíveis, têm sido descritos pelo amplo espectro de atividades biológicas, farmacológicas e terapêuticas (TAKAHASHI et al., 2002).

A sua distribuição no reino vegetal e a presença em diferentes tecidos vegetais têm sido amplamente estudadas. Uma das classificações agrupa em oito classes diferentes, definidas de acordo com o estado oxidativo e o número e tipo de substituintes no anel heterocíclico (RICARDO et al., 2001).

Desta forma, estudos mostram que os flavonóides também podem atuar na cascata de sinalização de diversas proteínas e lipídios, o que pode estar relacionado com os seus efeitos benéficos (AIYER et al., 2012).

Compostos fenólicos possuem grupo hidroxila ligados diretamente a um grupo hidrocarboneto aromáticos, sendo o mais simples grupo de antioxidantes, que combate o envelhecimento celular (radicais livres). Desencadeando estudos visando seu uso na terapia (SIMÕES et al., 2010).

2.2.1.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A natureza, fonte de medicamentos por milênios, cujo uso humano de tais fontes medicinais data de cerca de 2600 a.C., tem sido a base de sofisticados sistemas da medicina tradicional, como base de obtenção de diferentes compostos, documentando o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas (GORDON; DAVID, 2013).

Os produtos naturais são considerados fonte valiosa no desenvolvimento de fármacos contra várias enfermidades a fim de proteger o organismo contra os radicais livres. A patologia de várias doenças e afecções tem sua predisposição envolvida com a presença de radicais livres, fruto do estresse oxidativo (KRAMER-MAREK; CAPALA, 2012; VASI; AUSTIN, 2009).

As células estão sob pressão genotóxica de fontes endógenas e exógenas, principalmente no âmbito radiosensível. Estima-se que mais de dezenas de milhares de lesões ao DNA precisam ser reparadas para evitar mutações deletérias, bloqueio da replicação e transcrição e quebra cromossômica. A importância do reparo para a saúde humana é destacada pelo fato de que a falha aumenta a probabilidade de repassar o dano a células vizinhas e desenvolver tumores e outras doenças (DESOUKI et al., 2015; KREJCI et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas por organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal e fatores ambientais, como poluentes do ar ou fumaça de

cigarro e radiação solar. Existe uma infinidade de substâncias antioxidantes naturais, fisiológicas e sintéticas com potencial radioprotetor, como carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, que atuam nas estruturas celulares e evitam alterações funcionais (BENKOVIĆ et al., 2008b).

As moléculas altamente reativas podem danificar estruturas celulares e agirem no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, gerando possível "estresse oxidativo" que contribui para muitas condições patológicas e doenças. A regulação do estado redutor e oxidante (redox) é crítica para a viabilidade celular, ativação, proliferação e função orgânica. Organismos aeróbios têm sistemas antioxidantes integrados (enzimáticos e não-enzimáticos) que agem no bloqueio de efeitos nocivos (BIRBEN et al., 2012).

A inativação das espécies reativas de oxigênio deve ocorrer no interior das células, na maioria das situações a partir do efeito protetor frente às radiações ionizantes. Na prática clínica, o uso dos radioprotetores sintéticos é limitado pelos seus efeitos colaterais e alta toxicidade, como por exemplo, náuseas, espirros, soluços, sonolência, febre, gosto metálico durante a infusão, erupção cutânea, hipocalcemia, reações anafiláticas, sendo hipotensão e vômito os mais referidos (DMITRY et al., 2014; KONOPACKA; RZESZOWKAWOLNY, 2001).

O papel emergente dos radioprotetores vem sendo observado ao longo dos tempos. As células de mamíferos existem em um estado de cerco oxidativo em que a sobrevivência requer um equilíbrio ótimo de oxidantes e antioxidantes. As plantas têm uma habilidade inata de biossintetizar uma ampla gama de antioxidantes não enzimáticos capazes de atenuar o dano oxidativo. Os principais representantes das substâncias antioxidantes de origem vegetal são os compostos fenólicos, dos quais o grupo dos flavonóides é indicado como sendo o maior e mais importante (MARCUS, 2009; KASOTE, 2014).

Os mecanismos que controlam a apoptose permanecem desconhecidos. Referida como morte celular programada, é vista como parte integrante do programa de desenvolvimento, sendo frequentemente o resultado final de um curso temporal de eventos celulares. Por outro lado, muitos inibidores da apoptose têm atividades antioxidantes ou melhoram as defesas antioxidantes celulares. Embora exista uma variação nos sinais e nos eventos metabólicos celulares necessários para sua indução em diversos tipos de células, as características morfológicas associadas são altamente conservadas (HADDAD, 2004).

A radiação ionizante inicia o estresse oxidativo intracelular através da formação reforçada ROS (Espécie Reativa do Oxigênio) que ataca o DNA, isso é mais um motivo que torna a aquisição de radioprotetores uma necessidade urgente. Podemos dividi-los em

radiomodificadores e radiosensibilizadores. Os fitoterápicos naturais comportando-se como radiomodificadores, capazes de atuar em situações de exposição a radiações ionizantes, de forma profilática ou terapêutica, comportam-se como agentes radioprotetores e apresentam elevada ação antioxidante de forma eficaz e menos tóxica (LEE et al., 2010).

Na última década, tem havido muito interesse pelos polifenóis encontrados em plantas e nos seus potenciais benéficos, geralmente envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos. Na depuração de radicais livres, observamos a atuação de alguns fitoquímicos que possuem propriedades antioxidantes e ação imunostimulante (efeito radioprotetor). Dentre as principais classes de metabólitos secundários identificados em espécies vegetais temos os compostos fenólicos ou fenóis, os quais agem retirando as espécies reativas de oxigênio presentes no meio através de ação quelante (PANDEY et al., 2009; GUO et al., 2009).

2.2.2. RADIOPROTEÇÃO

2.2.2.1. RADIAÇÃO

A radiação ionizante (RI) tem natureza eletromagnética (raios-X e gama) ou corpuscular (beta e alfa), e na sua interação com a matéria tem a capacidade de ejetar elétrons dos átomos. Sua propagação, de um ponto a outro, se dá por qualquer meio, matéria ou no próprio vácuo. Sua interação com o meio depende da frequência da onda eletromagnética (OKUNO, 2013).

A exposição humana às radiações ionizantes aumentou nas últimas décadas, com o aumento de procedimentos médicos, tanto diagnósticos quanto terapêuticos, que fazem uso de fontes de radiação externa ou interna. Além disso, há de se ressaltar as exposições acidentais, os acidentes nucleares, as pesquisas em laboratórios e ainda as ameaças de terrorismo nuclear. Tudo isso vem conduzindo as medidas de radioproteção para que haja o desenvolvimento e aprimoramento de métodos de biodosimetria (medição da dose com base em modificações de parâmetros biológicos induzidos pela radiação), que sejam de resposta rápida e de fácil análise (PANNKUK et al., 2017).

Dentre as maiores prioridades relacionadas e demarcadas no âmbito da radiação e radioproteção associada, entidades governamentais estabeleceram pesquisas sobre: radioprotectores para uso antes da exposição; agentes terapêuticos para tratamento pós- exposição; terapia antimicrobiana para infecções associadas à exposição à radiação; citocinas

e fatores de crescimento; mecanismos de lesão por radiação nos níveis molecular, celular, tecido e organismo; bem como, automação de ensaios biodosimétricos (PELLMAR; ROCKWELL, 2005).

Os organismos vivos são profundamente afetados pelo dano celular induzido por radiação, seja proveniente de fontes naturais ou artificiais. A maior parte do dano biológico às Ris se deve ao efeito indireto, ou seja, ao processo de radiólise da água, que gera radicais livres, elétrons e íons, que por sua vez danificam o DNA. Isto se deve à abundância de água nas células, o que aumenta a probabilidade dos feixes de radiação virem a interagir com estas moléculas, e não diretamente com o DNA contido no núcleo das células (REISZ et al., 2014).

Métodos biodosimétricos que possam ser realizados de forma rápida e fácil são necessários como métodos de triagem, quando há um grande número de vítimas de exposições acidentais às radiações. Avanços recentes têm sido propostos para complementar os métodos atuais, principalmente em cenários complexos de exposições humanas às radiações (COY S et al., 2011).

Outro produto tóxico gerado pela radiólise da água são as espécies reativas de oxigênio (ROS). Todos estes compostos citados, ROS, elétrons, íons, radicais livres, podem danificar o DNA, molécula transmissora das características hereditárias de todos os seres vivos e, portanto, principal alvo da proteção radiológica (BLADEN et al., 2012).

As quebras da fita simples do DNA (SSBs – single strand breaks) são mais facilmente reparadas pela célula, uma vez que uma das fitas serve de molde para reparação do dano. Já as quebras da dupla fita do DNA (DSBs – double strand breaks) são mais difíceis de serem reparadas, e estão mais associadas à morte celular (apoptose) e à formação de aberrações cromossômicas. Os fitoquímicos quimiopreventivos, geralmente agentes não tóxicos com atividades preventivas e terapêuticas, evitariam a consolidação do dano ao DNA (NAMBIAR et al., 2011).

O dano ao DNA é reconhecido como fator causal para o desenvolvimento dos defeitos genéticos. As combinações químicas podem ocorrer de forma indesejada, devido a falhas nos mecanismos fisiológicos de reparação, gerando alterações estruturais e lesões, que podem induzir a morte desta célula. Os processos neoplásicos podem ser iniciados por estes danos, ocasionados por espécies químicas (radicais livres) extremamente instáveis e reativas, que possuem um ou mais elétrons não pareados num orbital, que ocorreram em gerações de células passadas e foram transmitidos. Os efeitos deletérios ao organismo podem ser observados a longo ou curto prazo (TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015).

A interação da radiação ionizante com o sistema biológico, pode resultar em efeitos deletérios ao nível molecular, quebras cromossômicas, erros no processo de divisão celular e vários tipos de mutações. Mesmo quando a divisão celular acontece, pode haver atraso mitótico ou propagação do dano e até a morte celular (SANKARANARAYANAN, 2006; UNSCEAR, 2011).

A radiação ionizante também apresenta finalidades terapêuticas e diagnósticas, por exemplo, radioterapia (justamente por promover o dano e morte das células tumorais) e exames imaginológicos (doses permissíveis). A presença de oxigênio e a formação de suas espécies reativas potencializam os eventos químicos que resultarão em mais efeitos biológicos durante a radioterapia. Os mecanismos de defesa antioxidante endógenos incluem vias enzimáticas e não enzimáticas, que tentam contrabalançar espécies reativas tóxicas de oxigênio sob vários processos fisiopatológicos (KAUR; ASEA, 2012).

2.2.2.2. EFEITOS BIOLÓGICOS RADIOINDUZIDOS

Como relatado no tópico anterior, as radiações ionizantes podem ser utilizadas para fins diagnósticos e terapêuticos e ao mesmo tempo são agentes mutagênicos bem conhecidos em seres humanos por induzirem a quebra de cromossomos (ação clastogênica). Se o dano molecular for muito grave para ser reparado, a célula sofre degradação dos principais componentes celulares. Seus efeitos prejudiciais não são restritos apenas às células irradiadas, mas pode atingir o tecido circunvizinho por efeito “bystander”, e manifestar vários efeitos biológicos mesmo à distância (KIM et al., 2015).

Fenômenos físicos, químicos, bioquímicos e celulares iniciados após a interação da radiação com o tecido biológico podem promover alterações morfo-funcionais (funções específicas das células). Estes efeitos podem ser notados em poucos minutos, horas, meses ou até mesmo anos após a exposição; mesmo quando a cadeia de eventos físicos (ionização e excitação) e químicos (rupturas de ligações químicas) ocorre em frações de segundo. Este fato levou à busca por substâncias com propriedades antioxidantes e radioprotetoras (MITCHELL et al., 2000; BITELLI, 2006).

Nos últimos anos, o campo da química de radicais livres teve destaque. Em condições normais, para a função fisiológica adequada, existe um equilíbrio entre os sistemas antioxidantes intra e extracelular e a produção de oxigênios reativos, ou seja, entre radicais livres e antioxidantes. Quando não observamos esta situação e o desequilíbrio se faz presente, antes do surgimento de sintomas, podem-se administrar substâncias que promovam a ativação

das ligações químicas entre certas enzimas e os radicais livres, conhecidas como radioprotetores. Existe um crescente interesse científico e público em correlacionar o stress oxidativo com uma variedade de condições patológicas (ICRP, 2012; LOBO et al., 2010).

As células expostas à radiação ionizante e a outros agentes genotóxicos podem comunicar o dano do DNA às células que não foram irradiadas diretamente. Este efeito ocorre subsequente a um dano direto ou indireto ao DNA, mas seus fundamentos moleculares não são completamente conhecidos, e sua denominação é efeito "bystander". Portanto, quando usado em radiobiologia, este termo se refere a um fenômeno em que as células não irradiadas exibem uma resposta (dano biológico) semelhante às células irradiadas "vizinhas", provavelmente devido à liberação de sinais químicos e inflamatórios daquelas expostas (GEORGAKILAS, 2014).

O estudo de biomarcadores de exposição às radiações ionizantes, tal como aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos acêntricos), e micronúcleos, permite avaliar o nível de exposição humana às radiações, especialmente em casos em que os indivíduos não fazem uso de dosímetros físicos (fotográfico, termoluminescente), como em acidentes nucleares. A quantificação de micronúcleos, que são oriundos de quebras de cromossomos visualizados em um estágio mais adiantado do ciclo celular, pode ser utilizada inclusive em triagens, em que houve a exposição de um grande número de indivíduos, por se tratar de um método de análise rápida e fácil (DUTTA, 2016; SATYAMITRA et al., 2001).

Além do contexto de exposições acidentais, a avaliação dos riscos à saúde dos indivíduos ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes é possível de ser realizada por meio de biomarcadores como micronúcleos, uma vez que maiores frequências de micronúcleos significam maior exposição destes profissionais, o que pode alertá-los quanto à observância das normas de radioproteção (SMEETS, 2004; AMARAL, 2005).

Mas o dano biológico radioinduzido não depende apenas do nível de exposição de indivíduos às radiações, e sim de vias metabólicas que desempenham papéis críticos, induzindo durante e logo após a exposição, respostas transitórias ao nível molecular, celular e tecidual, que pode vir a neutralizar os efeitos tóxicos da radiação e, conseqüentemente, o estresse celular. Diante disso, compostos que promovam a proteção de danos induzidos pelas RIs vem sendo amplamente investigados (AZZAM et al., 2011).

Além do nível de exposição e de questões metabólicas de indivíduos radioexpostos, há de se ressaltar também que os danos biológicos dependerão das características intrínsecas do tecido irradiado, ou seja, da radiosensibilidade destes tecidos, que varia de acordo com: nível

de diferenciação celular, atividade metabólica e taxa de proliferação celular e crescimento tecidual (TIWARI et al., 2009; GRUNDMAN et al., 2009).

Com isso, a magnitude do dano ao DNA depende da presença de antioxidantes e pode ser minimizada com o uso de agentes radioprotetores. Para entender o seu mecanismo destas substâncias, é essencial ter conhecimento dos danos biológicos das radiações ionizantes ao nível molecular, e da toxicidade tanto da radiação quanto de agentes químicos ao nível celular. Nenhum radioprotector sintético está hoje disponível justamente devido à citotoxicidade, o que leva a busca de fontes alternativas de origem natural, incluindo as plantas (BOWSHER et al., 2008; ARORA, 2005).

Por fim, é de suma importância que os programas de radioproteção acompanhem o aumento das aplicações nucleares, e o mesmo vale para o interesse público, para que eventuais riscos possam sempre ser minimizados. A inclusão do interesse por substâncias radioprotetoras em tais programas visa justamente a segurança à saúde, tanto para os trabalhadores ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes, quanto para o público em geral que possa estar potencialmente exposto às fontes de radiação (AMARAL, 2005; CAVALLI, 2007).

2.2.2.3. DOSIMETRIA BIOLÓGICA E MICRONÚCLEOS

As exposições humanas às radiações ionizantes conduziram a um aumento das necessidades de avaliação de efeitos biológicos radioinduzidos. Estudos sobre a identificação de biomarcadores após a exposição à radiação podem auxiliar identificando a dose individual absorvida, bem como a resposta biológica e alertar quanto aos cuidados médicos adequados após a exposição (PANNKUK et al., 2016).

As atividades de radioproteção objetivam controlar os riscos associados às exposições humanas às RIs, e para mensurar doses, são empregados instrumentos físicos sensíveis à radiação (i.e. dosímetros). Além disso, o conhecimento da quantidade de energia absorvida por unidade de massa, ou seja, da dose absorvida, constitui uma etapa importante na avaliação dos riscos associados a uma exposição. De forma complementar ou alternativa à dosimetria física, a dosimetria biológica, que se baseia na quantificação de biomarcadores de exposição às RIs, podem vir a auxiliar na percepção dos riscos relacionados a uma radioexposição (JAJTE et al., 2003; AMARAL, 2005).

A dosimetria biológica, diferentemente da dosimetria física, permite avaliar a variabilidade interindividual às RIs. Além disso, estudos mostram que as alterações

cromossômicas radioinduzidas em linfócitos podem permanecer nas células ao longo de sucessivas divisões celulares, permitindo a avaliação da dose mesmo semanas ou meses após a exposição. Tendo em vista que os linfócitos permanecem em estado de quiescência no ciclo celular, eles também armazenam o dano e se redistribuem por todo o corpo, e devido à sua fácil obtenção por punção venosa, podem ser avaliados a posteriori. O tempo mínimo para coleta de amostras de sangue é de 12 horas após a radioexposição, que é o tempo de recirculação dos linfócitos (IAEA, 2011).

Há o interesse atual por preconizar novos biomarcadores que levem em consideração as variabilidades interindividuais de respostas às radiações ionizantes, de maneira a ter protocolos de prevenção e intervenção de possíveis efeitos biológicos adversos exacerbados após radioterapias (Au; RUCHIRAWAT, 2009)

Em casos de incidentes radiológicos, a avaliação de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos acêntricos) vem sendo recomendada como método alternativo ou complementar à dosimetria física. O estudo dos danos citogenéticos permite alertar os médicos ou outros trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante com relação a possíveis riscos, bem como sua classificação mediante os efeitos da interação com a dose em: determinísticos (acima de 1 Gy) e estocásticos (abaixo de 1 Gy) (IAEA, 2011).

A presença de micronúcleos em células humanas está relacionada com várias ações mutagênicas. O surgimento de micronúcleos pode ser útil no monitoramento genotóxico de populações e na avaliação do potencial mutagênico de uma variedade de agentes químicos e físicos. Uma variedade de fatores influencia na sua formação, como: idade, sexo, constituição genética, agentes físicos e químicos e hábitos alimentares e de vida. Tendo em vista que a alimentação influencia na frequência de micronúcleos, é de se esperar que o mecanismo de ação seja justamente sobre espécies reativas de oxigênio, pois estas medeiam grande parte do dano ao DNA causado pela radiação ionizante. Para exemplificar, os carotenóides são conhecidos por serem bons neutralizadores de radicais livres, o que acarretaria numa redução nas frequências de micronúcleos (RIBEIRO et al., 2003; SABHARWAL et al., 2015).

Os danos oxidativos induzidos pela radiação ionizante podem resultar em carcinogênese e diminuição da resposta imune, danos aos sistemas hematopoiético, gastrointestinal e nervoso central. Sendo assim, a biomonitorização humana dos efeitos genéticos iniciais requer metodologias precisas, sensíveis, se possível, fáceis e de rápida execução, a fim de avaliar as mutações e alterações celulares pós-exposições agudas à radiação. A aplicação de métodos de quantificação de micronúcleos constitui uma técnica

citogenética mais simples e rápida do que a convencional, uma vez que não requer a análise individual dos cromossomos. Sua ocorrência pode representar uma resposta integrada de instabilidade cromossômica e viabilidade celular (KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001; NAKAMURA et al., 2017; KAUSAR et al., 2009; IARMARCOVAI et al., 2008).

2.2.2.4. ATIVIDADE RADIOPROTETORA

As atividades antioxidantes de muitos fitoquímicos dependem não apenas de seus níveis individuais, mas também das proporções entre os vários componentes e seus estados redox individuais. Bioativos são utilizados para o tratamento de muitas doenças e afecções, desde a antiguidade. Apesar da sua ampla aceitação, estudos de diferentes laboratórios freqüentemente relatam grandes variações nas suas bioatividades terapêuticas. Estudos estatísticos demonstraram que, demograficamente, a sociedade de países desenvolvidos utiliza medicamentos tradicionais detentores de compostos derivados de plantas medicinais (COCK, 2015).

Os níveis de exposição à radiação podem ser avaliados a partir da viabilidade de células. Dentre os biomarcadores de radiação, as aberrações cromossômicas são as mais utilizadas (RANA et al., 2010).

O uso de substâncias naturais pode ser relevante para a mitigação de danos induzidos por radiação ionizante em sistemas de mamíferos. Substâncias naturais e artificiais (antioxidantes) são estudadas por atuarem no desequilíbrio oxidativo causado pelo efeito das radiações ionizantes. Estas estabelecem ligações químicas com os radicais livres, sendo responsáveis por proteger ou diminuir os danos causados pela radiação aos tecidos vivos (MONTONO et al., 2011).

Radicais livres, particularmente espécies reativas de oxigênio, cujos agentes são oxidantes ou estimuladores do metabolismo oxidativo celular, são bem reconhecidos por desempenhar um duplo papel como espécies deletérias e benéficas. Alguns fitoterápicos foram reconhecidos recentemente como modificadores da resposta biológica, de origem natural, com elevada capacidade antioxidante. Os efeitos danosos da radiação podem ser minimizados por substâncias radioprotetoras, ou podem ser potencializados por substâncias radiosensibilizadoras, sendo estas substâncias denominadas radiomodificadores (VALKO et al., 2006; FILHO et al., 2001).

Reações oxidativas nos sistemas biológicos resultam em sérios danos cromossômicos estruturais. Ocorre, por exemplo, pela ligação dos átomos do DNA com os elétrons livre de

radicais específicos. Informações adequadas sobre as plantas medicinais e suas propriedades, precisam ser corretamente divulgadas, como alerta esclarecedor a despeito principalmente da sua toxicidade (BRUMAGLIM, 2009; MARTINS; GARLET, 2016).

Devido ao aumento do uso de radiações ionizantes em vários aspectos da vida humana, especialmente em áreas relacionadas à radioterapia de câncer, preservação de alimentos, agricultura, indústria e geração de energia, faz-se necessário o desenvolvimento de um radioprotetor eficaz e não tóxico (MAURYA et al. 2006).

Numerosos estudos têm sido focados em antioxidantes naturais identificados como antimutagênicos. O uso de produtos naturais como anticancerígenos tem uma longa história que começou com a medicina tradicional. Antioxidantes geralmente agem através da inibição do passo de iniciação e geração levando à terminação da reação e retardam o processo de oxidação (KHALIGHI-SIGAROODI et al., 2012).

A Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com os organismos sob condições específicas de exposição. Além da letalidade, outros parâmetros também são investigados: o potencial tóxico em órgãos específicos, a identificação da toxicocinética e a relação dose-resposta; indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe (OGA; SIQUEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008).

Encontrar antioxidantes naturais que substituam os compostos sintéticos em aplicações de alimentos é uma tendência crescente nas preferências do consumidor, o que aumenta a exploração das suas fontes naturais destes. Seu efeito tóxico pode levar a alterações na permeabilidade da membrana, inibição enzimática e até mesmo morte celular (ROGERO et al., 2006).

Espécies de plantas medicinais são úteis na produção de fármacos biológicos e podem conter compostos úteis de ação radioprotetora. Deve-se considerar a necessidade e o tempo de realização dos seus testes de toxicidade e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular). A escolha de um sistema de ensaio apropriado é particularmente importante (ALVES et al., 2000).

Existe uma demanda crescente por ensaios in vitro para rastreio de drogas a fim de reduzir o custo e o tempo de melhorias e lançamentos de novos ensaios. Os linfócitos são células de fácil obtenção, que se redistribuem por todo o corpo, e que armazenam os danos em G0, sendo excelentes candidatos como biomarcadores de exposição às RIs (ZANG et al., 2016).

2.3. JUSTIFICATIVA

O Brasil abriga diversos tipos de ecossistemas, cada um com suas particularidades, sendo verdadeira fonte quase que inesgotável de moléculas a serem descobertas. Devido à expansão do uso das radiações ionizantes na indústria, medicina e pesquisa, o interesse em encontrar substâncias com características radioprotetoras tem aumentado, ou seja, substâncias com propriedades antioxidantes com o objetivo de proteger e diminuir os danos causados aos tecidos vivos.

Ao longo das últimas duas décadas, a descoberta de drogas tem testemunhado avanços sem precedentes com a utilização de produtos naturais. Quando os bioativos são identificados com propriedades farmacológicas, observa-se a possibilidade do desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre estes compostos, os que possuem radical fenólico podem desempenhar ações radioprotetora e antioxidante.

Em revisão de literatura, observou-se que poucos estudos foram realizados a cerca das propriedades farmacológicas ligadas aos metabólitos secundários do *Conocarpus erectus* L, bem como, sobre a sua capacidade de ativação do mecanismo efetor de células antioxidantes e se o mesmo apresenta atividade citotóxica, além da sua toxicidade e utilização como agentes radioprotetores.

Estas limitações nos estimula a avaliar cientificamente a presença ou ausência de tal capacidade. Este trabalho trata-se de um estudo inovador a respeito de plantas encontradas nos manguezais do Brasil, especificamente o *Conocarpus erectus*, uma espécie cujo uso popular no tratamento de diversas doenças já é amplamente observado.

Diante disto, o presente estudo visou a análise da citotoxicidade do flavonóide majoritário isolado de *Conocarpus erectus*, bem como a avaliação da sua atividade radioprotetora sobre linfócitos humanos (in vitro) em exposição à radiação gama.

3.4. OBJETIVOS

3.4.1. Objetivo geral

Investigar a presença e isolar o flavonóide majoritário do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* (EAFCe), avaliar a sua atividade citotóxica e explorar a sua ação radioprotetora em linfócitos humanos expostos à radiação gama.

3.4.2. Objetivos específicos

3.4.2.1. Investigar a presença de compostos fenólicos no EAFCe.

3.4.2.2. Identificar e isolar o flavonóide majoritário do EAFCe.

3.4.2.3. Analisar a citotoxicidade do flavonóide isolado de EAFCe em linfócitos humanos (in vitro).

3.4.2.4. Definição do espectro da RMN do flavonóide majoritário do EAFCe.

3.4.2.5. Verificar o potencial efeito radioprotetor desse flavonóide de EAFCe em linfócitos humanos (in vitro) expostos à radiação gama.

3.5. MATERIAIS E MÉTODOS

3.5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo pré-clínico in vitro sobre atividades citotóxica e radioprotetora do flavonóide isolado de EAFCe em linfócitos humanos expostos à radiação gama.

3.5.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa, sob a coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, foi dividida em duas etapas: A primeira etapa foi dedicada a obtenção do flavonóide isolado do EAFCe. Para tal, as folhas (20Kg), de *C. erectus*, foram coletadas no mangue do município de Itamaracá-PE, distrito de Vila Velha; para posteriormente serem encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa Translacional e Inovação Terapêutica (LPTIT) do Departamento de Histologia e Embriologia CB/UFPE, onde foi preparado o EAFCe, sendo este, encaminhado para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), onde foi liofilizado. No Instituto Nacional do Semi-árido (INSA)/PB realizou-se o perfil fitoquímico do EAFCe e em outro momento, o isolamento do flavonóide do EAFCe.

A segunda etapa foi dedicada à realização de dois importantes testes: o primeiro foi o teste de citotoxicidade no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA) do Departamento de Energia Nuclear (DEN), onde também se realizou, a coleta do sangue periférico dos voluntários, e a irradiação das amostras. Em seguida, foi realizado o teste de genotoxicidade no laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), e leitura das lâminas, confeccionadas no laboratório Central (LabCen/UFPE).

3.5.3. OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

3.5.3.1. Etapa Botânica

3.5.3.1.1. Obtenção do material botânico

As folhas de *Conocarpus erectus* L. foram coletadas, de forma manual, em estágio adulto no período de floração (março de 2015) no manguezal da cidade de Itamaracá, distrito

de Vila Velha, no estado de Pernambuco, com 7° 40' de latitude sul e 34° 50' longitude oeste, sendo selecionadas folhas verdes, com aparência vistosa, visualmente intacta, livre de danos mecânicos, pragas, doenças ou cor alterada. Uma exsicata do material botânico foi identificada pela bióloga Professora Doutora Marlene Barbosa e depositada no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob número UFP: 75.457 (Anexo A). A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle de Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos (CPRH) sob autorização CADFRBN.120/2014 (Anexo B).



Figura 1. Imagem de satélite do local de coleta do *C. erectus* (7° 40' latitude sul e 34° 50' longitude oeste). Fonte: Google Maps, data:10/07/2017.

3.5.3.1.2. Extração de folhas de *Conocarpus erectus* L.

O extrato foi obtido no LPTIT do Departamento de Histologia e Embriologia CB/UFPE, preparado por infusão a partir de 20 Kg de folhas frescas de *C. erectus* L. O material foi pesado, moído (manualmente) e a infusão foi realizada por adição de água destilada a 40° C durante 30 minutos. O extrato aquoso foi liofilizado, no laboratório do LIKA e armazenado a temperatura ambiente no LPTIT. O rendimento da extração foi de 1,38% utilizando como base 250g de folhas frescas da espécie em questão.



Figura 2. Exemplares de *Conocarpus erectus* coletados e utilizados nesta pesquisa. Fonte: próprio autor.

3.5.3.1.3. Análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EAFCe

O EAFCe foi analisado no INSA/PB em CLAE (1200 Infinity Series, Agilent) equipado com bomba quaternária, amostrador automático, forno de coluna e detector de arranjos de diodos numa coluna RP 18 (Zorbax SB-C18, Agilent, 4,6 x 250 mm, 5 μ m). A amostra de 5 μ L foi submetida a um gradiente linear (A: ácido acético a 0,3% em água, B: Acetonitrila): 98% A (0 min) - 90% A (10 min) - 15% A (27 min) num fluxo de 2,4 mL/min a 30° C. Os componentes do extrato foram comparados com os padrões de Rutina, Luteolina, Quercetina, Catequina, Apigenina.

3.5.3.1.4. Purificação e Isolamento do flavonóide majoritário por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EAFCe

As frações isoladas do EAFCe foram coletadas em diferentes tubos através de corridas preparativas (Autopurification system, Waters/Milford USA, equipado com bomba binária 2545, 2767 Sample Manager, System Fluidics Organizer, Detector de Arranjo de Diodos 2998, Detector de massas ACQUITY QDa, MassLynx Software FractionLynx Application Manager). A separação foi realizada numa coluna de fase reversa (XBridge C18, Waters, 10 x 100 mm, 5 μ m). As amostras (900 μ L) foram submetidas a um gradiente linear em fluxo de 9,0 mL/min (A: ácido acético a 0,3% em água, B: Acetonitrila): 94% A (0 min) - 65% A (8 min). As frações do EAFCe foram combinadas em uma amostra e em seguida o solvente foi

removido sob pressão reduzida (Rocket evaporator, Thermo Scientific, Cambridge, USA, método para amostras aquosas) em temperatura de 40° C. Após remoção do solvente, a amostra foi ressuspensa para obtenção de uma concentração de 5 mg/mL e submetida à uma segunda corrida preparativa, para o isolamento. A amostra final (900 µL) obteve rendimento do flavonóide desta extração de 1,8%.

Nossas experiências também levaram à designação por RMN dos carbonos por acoplamentos de duas ligações de H-6 e H-8 a C-5, C-7 e C-7, C-9 respectivamente. Para flavonóides com um grupo carbonilo em C-4, C-5 também mostrou ligação dupla acoplamento ao próton hidroxilo em C-5. De nossos estudos de RMN, as seguintes conclusões podem ser desenhado. Para 5,7-di-hidroxiavonas e flavonóis, o H-6 mostra campo de ressonância do H-8. No entanto, o H-6 de 5,7-di-hidroxiavononóis e flavanóis mostra campo de ressonância do H-8, que quase ressoam no mesmo campo. Os espectros de RMN dos flavonóides estudados aqui mostram que C-8 ressoa em campo mais alto.

3.5.3.2. Etapa Biológica

3.5.3.2.1. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Brasil no 1.870.360 / 2016) (anexo A) e os indivíduos foram esclarecidos quanto aos procedimentos necessários para a participação do estudo. Todos os procedimentos relacionados ao estudo foram iniciados apenas após o esclarecimento e autorização dos voluntários através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

3.5.3.2.2. Casuística: critérios de inclusão e exclusão

- Critérios de inclusão: Células viáveis isoladas de sangue periférico de indivíduos voluntários, não fumantes e sem uso de medicamentos que influenciam a resposta imunológica; culturas e lâminas não contaminadas.

Critérios de exclusão: Células isoladas de sangue periférico de indivíduos portadores de doenças infecciosas e tumorais, não expostos a agentes genotóxicos (ex: produtos químicos, radiação, etc) em níveis que possam aumentar o background de incidência de micronúcleos; cultura e lâminas contaminadas.

3.5.3.2.3. Definição e categorização das variáveis

O estudo foi definido e caracterizado por variáveis dependentes e independentes:

Tabela 1: detalhamento das variáveis dependentes e independentes da pesquisa

VARIÁVEL DEPENDENTE	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico.	Quantitativa contínua
Viabilidade Celular	Suficiente desenvolvimento e conveniente regularidade de conformação para as exigências da vida celular.	Quantitativa contínua

VARIÁVEL INDEPENDENTE	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO
Partes da planta	Porção de <i>C. erectus</i> L. coletadas para confecção do extrato.	Folha
Concentração do extrato para obtenção do flavanóide	EAFCE diluídos progressivamente em RPMI	5,0 µg/mL
Concentração do flavanóide para viabilidade celular	Flavanóide majoritário isolado de EAFCE diluídos progressivamente em RPMI	1,0; 10,0; 50,0; 100,0 µg/mL
Concentração do flavanóide para avaliação da atividade radioprotetora	Concentração do flavanóide isolado de EAFCE utilizada para avaliar a radioproteção de linfócitos expostos a radiação gama.	0,5; 1,0 µg/mL

3.5.3.2.4. Coleta de Amostras Sanguíneas

Para o experimento (in vitro), na coleta das amostras biológicas, obteve-se células selecionadas por conveniência, a partir de aproximadamente 4 mL de sangue periférico humano de voluntários adultos, saudáveis, não fumantes, sem infecções ativas nos últimos três meses, imunossupressão e/ou doença auto-imune.

Foram coletadas as amostras de 04 indivíduos (2 homens e 2 mulheres) com idades entre 18 e 40 anos, destinados em sequência para os devidos teste em triplicata. No teste de Citotoxicidade, utilizamos o sangue coletado dos 04 indivíduos e no de Genotoxicidade, utilizamos apenas o de 01 indivíduo (segundo protocolo preconizado pelos laboratórios respectivos, onde cada teste foi realizado). De cada indivíduo, foram coletados 4 mL de sangue periférico em tubos estéreis contendo heparina sódica (Vacurette).

3.5.3.2.5. Processo de irradiação das amostras biológicas, especificações das condições de irradiação e doses administradas

A amostra foi irradiada com uma dose de radiação de 3 Gy de raios gama, proveniente de uma fonte de cobalto-60 (Gammacell 220 Excel), com taxa de dose de (2,657 kGy/h). A fonte irradiadora foi posicionada de modo a garantir a homogeneidade da irradiação da amostra.

3.5.3.2.6. Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

Para obtenção das PBMCs, foram coletados 4 ml de sangue de cada um dos doadores voluntários (tópico 5.3.2.4.), em tubos de heparina (Vacuette), sobre um gradiente de densidade (concentração), o ficoll (densidade = $1,077 \pm 0,001$ g.mL / Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare Life Sciences, Suécia) na proporção de 1:1 e centrifugados a 400 x g por 45 minutos (4 acel/0 brake). Após a centrifugação, as células obtidas e transferidas para tubo cônico (Falcon) foram lavadas, por duas vezes, pela adição de solução de PBS estéril (Phosphate Buffered Saline - pH = 7,2-7,4) na proporção de 1:2 (2PBS:1PBMC). Em sequência, foram novamente centrifugadas (400g por 30 min a 20°C - 6 acel/4 brake), obtendo-se um anel de PBMC, que foi recolhido. As células foram então contadas numa câmara de Neubauer.

Após o término da centrifugação e das lavagens, o sobrenadante contido no tubo foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado, adicionado 5 mL de meio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) ao botão celular.

3.5.3.3. Teste de Citotoxicidade

Com a finalidade de estimar o percentual de células viáveis, o estudo da viabilidade celular foi realizado com cálculo feito de acordo com o planejamento para preparação da solução de plaqueamento com 1×10^6 células. O teste de citotoxicidade utilizado foi o MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo). Para tal, as amostras PBMCs (obtidas no tópico 5.3.2.6.) foram ajustadas a uma concentração de 5×10^6 cél/100 μ L de meio RPMI 1640 (Sigma- Aldrich, EUA) suplementadas com Soro Fetal Bovino a 10% (p / v) (Sigma-Aldrich, EUA)(SFB) e incubadas nas seguintes condições:

- 150 μ l de meio RPMI em todos os poços para o branco (Sem Célula).
- 100 μ l de células + 50 μ l de meio RPMI suplementado com SFB.

-100 µl de células + 50 µl de meio RPMI suplementado com SFB na presença do flavonóide isolado do EAFCE nas concentrações de 1,0; 10,0; 50,0 e 100,0 µg/mL.

As células foram incubadas em triplicatas em placa de 96 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça) a uma densidade de 10⁶ Células/poço, durante 48 horas em estufa a 37° C. Após esta etapa de incubação, foi adicionado à cultura solução de MTT (sal de tetrazolium / Sigma-Aldrich, Brasil) a 0,5 mg/mL e as placas retornaram à incubadora por mais 3 horas (este passo foi feito com as luzes apagadas, pois o MTT é fotossensível). Em seguida, foram adicionados 120 µL da solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20% para dissolução do precipitado, deixando em sequência, protegido da luz à temperatura ambiente

Após 24 horas, a absorbância, lida em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 570 nm (Modelo EL808, BioTek, USA), pertencente ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens terapêuticas (LINAT) da UFPE, demonstrou, na presença do flavonóide isolado do EAFCE na concentrações de 1,0 µg/mL, a viabilidade > 98%.

3.5.3.4. Teste de Genotoxicidade

As PBMCs (obtidas de sangue irradiado), foram ajustadas a uma concentração de 10⁶ células/poço em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça) na presença e na ausência do flavonóide isolado do EAFCE nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL, estimuladas com a fitohemaglutinina (PHA) e levadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para controle positivo da genotoxicidade foi utilizado a doxorribicina (2,0 µg/mL), substância conhecida mutagênica.

Após o tempo de cultivo (protocolo laboratorial LINAT), as amostras foram retiradas da estufa. Foi acrescentada citocalasina B. A solução estoque (100 µL) de citocalasina B (0,1 mg/mL) foi colocada em meio RPMI para obter uma solução final de 3 µg/mL. Em seguida colocadas novamente na estufa, permanecendo por mais 3 horas totalizando 96 horas de cultura. Após a adição do tratamento (flavonóide isolado do EAFCE nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL, respectivamente), a cultura foi centrifugada por 7 min (1500 rpm, aceleração 6, freio 4) e descartou-se o sobrenadante.

Na confecção das lâminas, previamente identificadas, utilizadas para leitura, o sedimento foi ressuspenso em 1,0 µL de fixador, em seguida, com uma pipeta automática de 50 µL, tendo-se gotejado 3 a 4 gotas da amostra em pontos distintos da lâmina (devidamente identificada), que secou em temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram imersas

em solução de Giemsa a 5% por 2 minutos. Após este período as lâminas secaram a temperatura ambiente.

A análise celular foi realizada através da utilização de um microscópio óptico com objetivas de 10x e 100x (Medilux), no LabCen/UFPE. Os micronúcleos foram localizados, quantificados, analisados e fotografados. Para cada grupo foram analisadas 300 células, segundo protocolo da AIEA (2011). Todas as observações foram realizadas por meio do teste duplo cego.

3.5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A leitura possibilitou a identificação das concentrações ideais para a análise da provável ação radioprotetora sem a presença da possível toxicidade do flavonóide isolado do EAFCe. Todas as observações foram realizadas por meio do teste duplo cego, os quais foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais e foram analisados inferencialmente através do teste Qui-quadrado de Pearson com o objetivo comparativo entre os grupos. O quantitativo dos micronúcleos foi correlacionado com o grau de lesão que as células sofreram. A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%.

4.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.1. Isolamento e Purificação de Flavonóide do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* através da Prospecção fitoquímica do EAFce por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A verificação do perfil qualitativo do EAFce obtido por CLAE foi analisado por corridas analíticas. A Figura 3.A representa o cromatograma de pico de base (BPC) da CLAE, mostrando regiões representativas de compostos com intensidade de absorvância de 256 nm, caracterizados com base no seu tempo de retenção e dados espectrométricos, bem como suas massas, comparados com os padrões.

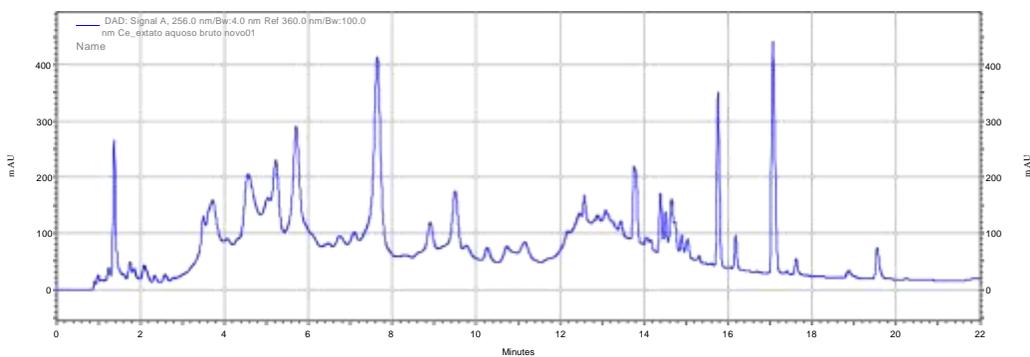
A cromatografia realizada possibilitou a observação dos principais compostos, escolhidos para identificação, no EAFce, os quais não tiveram semelhanças com os padrões. Dentre os resultados do estudo fitoquímico do extrato aquoso desta espécie vegetal, identificamos, em sua composição diversas classes de compostos do metabolismo secundário.

Os principais compostos da EAFce foram caracterizados pela comparação do tempo de retenção e dos dados espectrométricos de UV com os de vários padrões. A partir dos picos do cromatograma (BPC) da CLAE do EAFce, observamos frações de compostos com características espectroscópicas e tempo de retenção variando de 1.227 a 21.093.

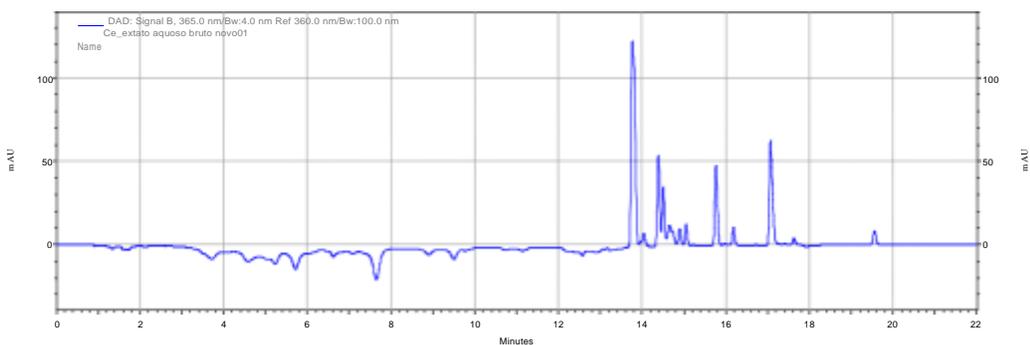
A Figura 3.B representa o cromatograma de pico de base (BPC) da CLAE, mostrando regiões representativas de flavonóides com intensidade de absorvância de 256 nm, caracterizados com base no seu tempo de retenção e dados espectrométricos, bem como suas massas, identificados em nossa amostra e comparados com os padrões.

A cromatografia realizada possibilitou a observação dos principais flavonoides, escolhidos para identificação, no EAFce. Como resultado do estudo fitoquímico do extrato aquoso desta espécie vegetal destacamos os flavonóides (3',4'-OH), dentre os quais podemos isolar o flavonoide majoritário, o qual foi utilizado no decorrer dos testes biológicos (figura 3.C).

A



B



C

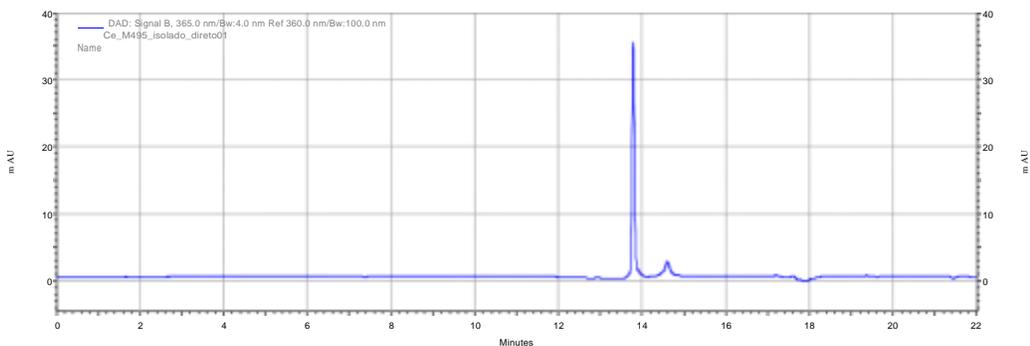


Figura 3: Cromatograma dos principais compostos detectados no EAFCe pelo à 256nm e Análise do cromatograma do principal pico da fração do extrato aquoso de *C. erectus*.

O extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* apresenta polifenóis entre outros componentes apoiando a hipótese de que exibem propriedades imunomoduladoras e antioxidantes (NASCIMENTO et al., 2016; CHEN et al., 2016).

A composição fitoquímica e as propriedades farmacológicas de *C. erectus* têm sido estudadas há muitos anos. A maioria desses estudos tem investigado principalmente suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Os compostos fenólicos são os principais componentes desta espécie (RAZA et al., 2016; SHOHAYEB et al., 2013; ABDEL-HAMEED et al., 2014; ABDEL-HAMEED et al., 2012).

Corroborando com nosso estudo Sharma et al. (2016) obteve uma resposta rápida aos vários tipos de compostos bioativos, quando analisou a cromatografia fitoquímica dos mesmos.

A pesquisa fitoquímica se faz necessária, tendo como objetivo conhecer os seus compostos, avaliando sua presença e identificando grupos de metabólitos secundários relevantes e úteis, na qualidade da matéria prima medicinal e na prospecção da biodiversidade ou bioprospecção (SIMÕES et al., 2010; BRAGA, 2009).

Estudos fitoquímicos auxiliam na detecção de propriedades farmacológicas em extratos brutos de plantas medicinais. Pesquisas de screening fitoquímico são comuns na literatura e mostram-se importantes para o conhecimento de novas substâncias com potencial terapêutico (BESSA et al., 2000)

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de extratos de acetato de etilo e n-butanol de folhas, caule, flores e frutos de *C. erectus* revelou a presença de ácido gálico (1), Catequina (2), apigenina (3), quercetina (4), quercetina-3-O-glucosido (5), kaemferol-3-O-glucosido (6), Rutina (7) e quercetina-3-O-lucosídeo-6-O-gálico (8) (ABDEL-HAMEED et al., 2012). *Conocarpus erectus* também contém conocarpol e 2'-methoxyconocarpol, lignana do tipo simples 1,4-diarylbutane e conocarpan uma lignana do tipo dehydrodi-isoeugenol. Ácido elágico (10), vescalagina (11)/castalagina (12) e di-(hexa-hidroxi Difenilo) Isômero de galloyl hexose foram identificados no extrato metanólico desengordurado de frutos de *C. erectus* (BARROS, 2000; ABDEL-HAMEED et al., 2014).

A presença dos compostos fenólicos no extrato vegetal reforça a capacidade antimicrobiana, além de funções antioxidante. Os flavonóides podem influenciar nas funções de células ligadas às enzimas e vias envolvidas em processos anti-inflamatórios e em proteínas inflamatórias de macrófagos (SÁNCHEZ et al., 2006; MELCHOR et al., 2001).

O estudo fitoquímico realizado preliminar do extrato de folhas de *C. erectus* a partir da CLAE a fim de purificar e isolar o composto de interesse deste trabalho, o flavonóide majoritário. (figura 4).

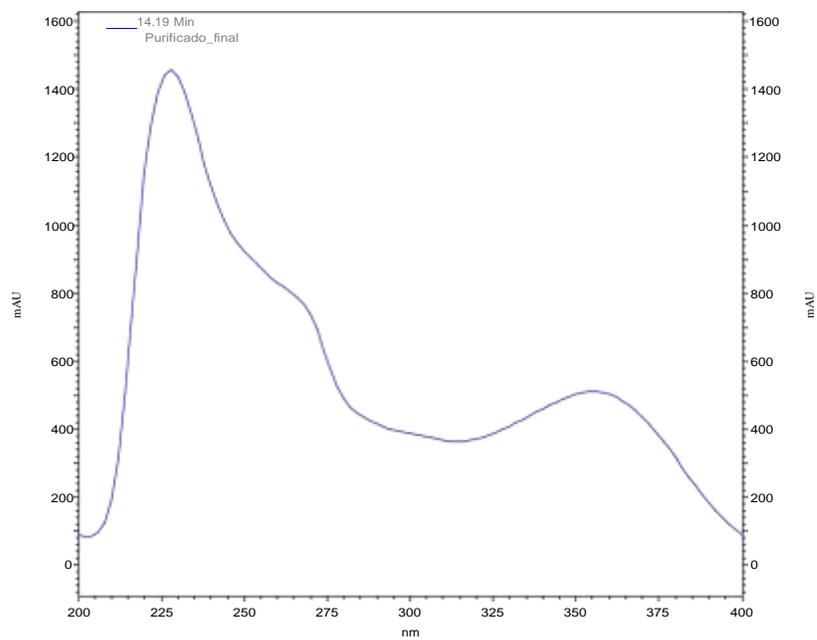
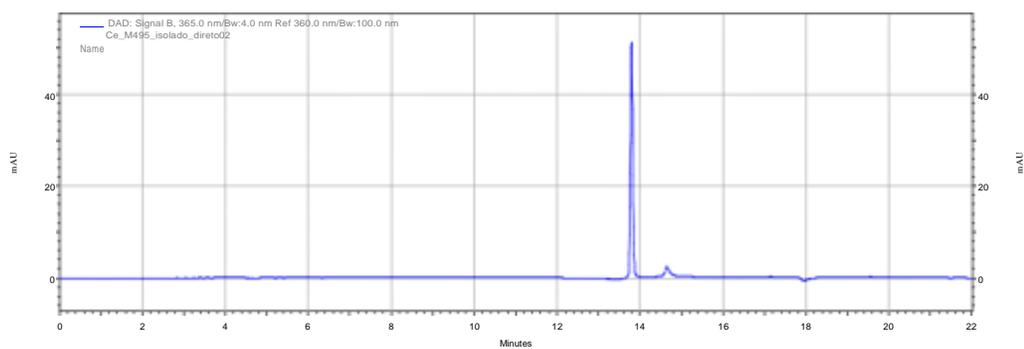
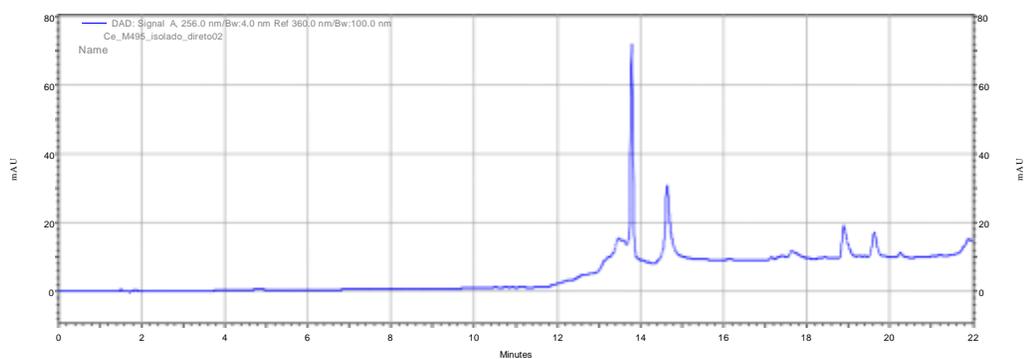


Figura 4: Flavonoide isolado doEACe

A análise dos espectros de UV dos compostos encontrados, nos tempos de retenção de na nossa amostra são semelhantes aos de compostos secundários o que nos possibilita afirmar que estes são do grupo dos flavonoides (figura 5).

Os flavonóides, encontrados nas plantas, são compostos com propriedade capazes de inibir reações de auto-oxidação e eliminação de radicais livres. Os flavonóides podem possuir múltiplas propriedades para eliminação de oxigênio reativo e nitrogênio espécies, cuja ação necessita ser melhor estudada.

Observamos em nosso estudo que a capacidade dos flavonoides esta não apenas na sua capacidade em inibir a oxidação, pois os mesmos podem atuar nestas reações também de forma indireta, apenas potencializando a mesma.

Alguns estudos mostraram que os flavonóides de diversos fitoterápicos têm efeitos significativos sob o sistema nervoso e derme de proteção. Dentre os principais componentes encontrados em extratos de plantas, os flavonóides (flavonas e flavonóis glicosídeos) apresentam destaque (ORHAN, 2013; LIU, 2014).

A prevenção do estresse oxidativo foi atribuída aos flavonóides, que também podem modular a atividade tanto de enzimas quanto de receptores, atuando como fitoterápicos ou medicamentos multialvo. No entanto, em certas concentrações, os flavonóides podem também atuar como pró-oxidantes, esgotando os sistemas de defesa nucleares antioxidantes e levando a danos oxidativos no DNA (ZHU, 2014).

Burda S. et al (2001) corroborando com nossos achados, objetivou elucidar a relação entre a estrutura química dos flavonóides e a sua capacidade para inibir a oxidação, bem como mostrar sua eficácia como eliminadores de radicais livres (DPPH). O estudo envolveu sete, estruturalmente, diferentes grupos de flavonóides.

Huang S. W. et al (1996), relatam que o grau de solunilidade dos flavonoides e a sua possível partição dos compostos em duas ou mais fases não influencia significativamente os resultados da sua capacidade de oxidação.

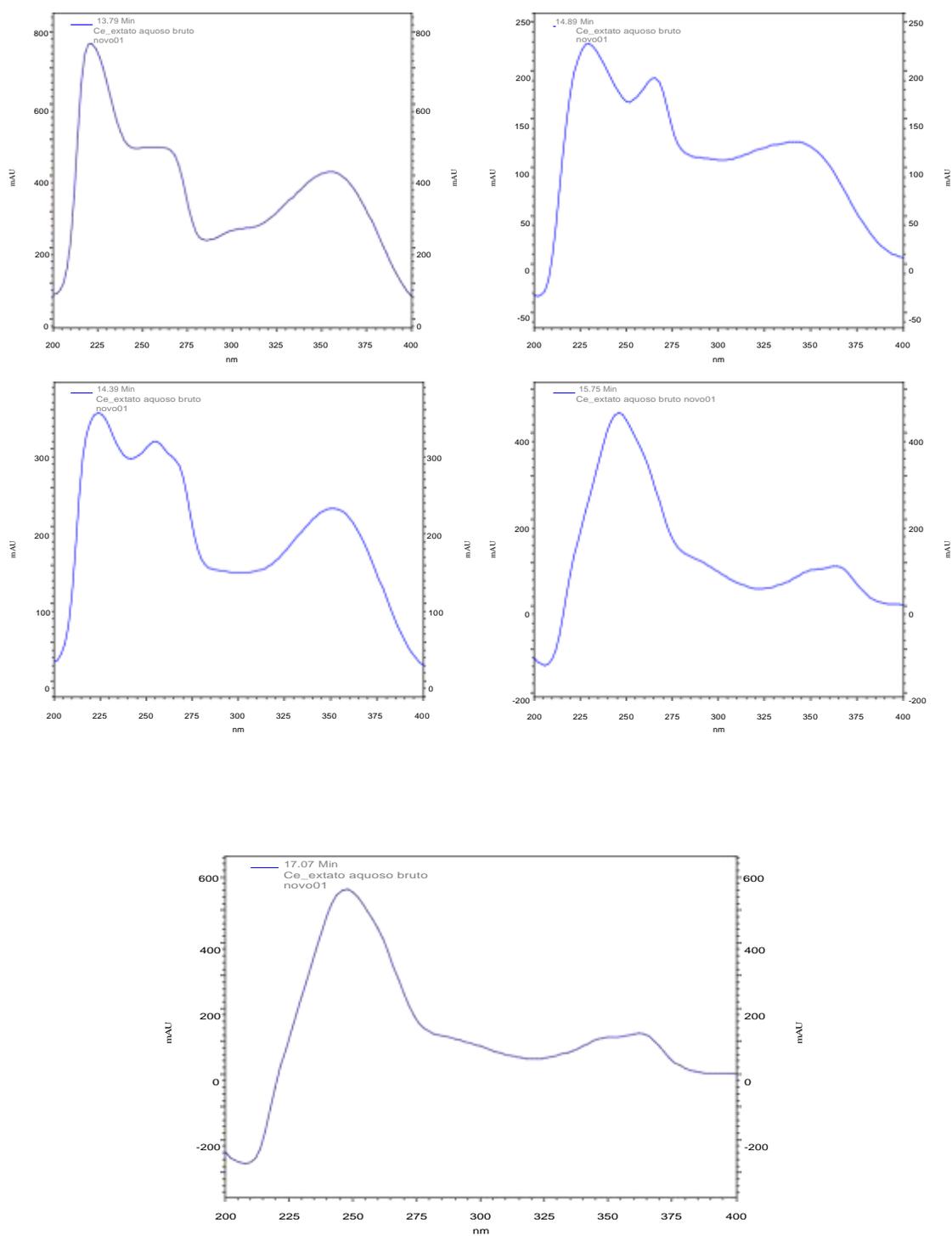


Figura 5: espectros dos flavonoides encontrados no EAFCE

4.6.2. Estudo da viabilidade celular, Análise dos micronúcleos e Avaliação da Atividade Radioprotetora do Flavonoide majoritário isolado de EACe

O presente estudo analisou a viabilidade por meio do MTT de células expostas ao extrato aquoso de folha de *C. erectus*, conforme preconizado por Ferrera et al. (2007), com algumas modificações.

O teste de citotoxicidade mostrou que a concentração de 1,0 µg/mL do Flavonoide é a mais indicada para realizar os testes relacionados a radioproteção, levando em consideração uma concentração que não induziu morte celular significativa e que pode induzir imunogenicidade. A viabilidade média de linfócitos que permaneceram vivos após esse tratamento foi superior a 98%, resultados estes estatisticamente significativos com relação às demais concentrações utilizadas (10,0; 50,0 e 100,0 µg/mL).

Os dados foram expressos descritivamente através das medidas estatísticas (média, desvio padrão e mediana) e foram analisados inferencialmente através do teste de Kruskal- Wallis com comparações do referido teste. Os resultados da citotoxicidade de cada concentração identificou o de melhor concentração para uso, destacando a média menos elevada da amostra de 1,0 µg/mL, com diferença significativa ($p < 0,05$) para a margem de erro fixada (5%) com relação as demais concentrações.

Os resultados desta etapa do estudo mostraram que o flavonóide isolado de EAFCE não induziu toxicidade celular em linfócitos humanos na concentração de 1,0 µg/mL.

Atualmente, os estudos sobre a propriedade biológica promovida por compostos naturais indicam que doses menores devem ser suficientes para induzir atividades imunológicas ou antitumorais (ZHENG et al., 2016).

Não há relatos na literatura sobre atividade citotóxica do *C. erectus* em células imunológicas. Estudos realizados com plantas pertencentes à mesma família do *C. erectus* (Combretaceae) mostraram que o extrato etanólico não apresentou danos às células quando testado (ZOU et al., 2015), tendo esta afirmação como válida, pode-se deduzir que os componentes do extrato, quando isolados, também não serão citotóxicos.

O uso popular tradicional não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não são diferentes de quaisquer outros xenobióticos sintéticos, e a permissão oficial do uso como drogas deve ser baseada em evidências experimentais (ARGENTA et al., 2011).

Sendo assim, Silva et al. (2015) determinaram que o teste de citotoxicidade é um importante passo nas investigações toxicológicas de extratos de plantas, constituindo uma das avaliações farmacognósticas preliminares para observar os possíveis efeitos tóxicos do extrato na fisiologia dos organismos, explorando os recursos manipulados pela população para uma perspectiva da produção farmacêutica.

Rawa et al. (2016), estudando o flavonóide, observou em seu ensaio de viabilidade um potencial efeito citotóxico sobre o organismo. Avaliou também o efeito deste flavonóide sobre a viabilidade celular e da mesma forma houve um decréscimo da viabilidade predominante nas maiores concentrações testada, indicando que pelo menos parte do efeito observado sobre a proliferação deve-se a uma diminuição da viabilidade celular. Em nosso estudo, o resultado obtido com flavonóide isolado do extrato de *Conocarpus erectus* corroborou com os deste estudo.

Estudos sobre a citotoxicidade de flavonóide isolado dos extratos da folha, caule e raiz de plantas do mangue brasileiro, refletem a baixa citotoxicidade dos mesmos ou não reportam dados relevantes em publicações anteriores. É possível inferir que o Kaempferol apresenta efeito tóxico em altas concentrações, capazes de reduzir a viabilidade e interferir no ciclo celular (TÁSSO, 2017).

Maurya et al. (2006), realizou com estudo extrato metanólico das folha, caule e raiz de *R. mangle* da Península de Yucatan no México e de forma contrária revelou atividade citotóxica dos extratos em células HeLa, sugerindo que tal capacidade tenha sido causada pelos compostos secundários da planta. O mesmo estudo não evidenciou citotoxicidade, contudo não foi realizada a caracterização do perfil fitoquímico da planta para correlacionar com o nosso resultado obtido.

Compostos secundários são diretamente influenciados pelo solo, temperatura, salinidade, poluição ambiental, e que a depender dos fatores fenotípicos uma mesma planta poderá ter funções diferentes em locais diferentes (NAGEM et al., 2008; SILVA et al., 2010). Além disso, a utilização de solvente extraem metabólitos com diferentes polaridades a partir de plantas medicinais, configurando diferentes atividades biológicas (TAN et al., 2011)

A determinação do teste de citotoxicidade é um importante passo nas investigações toxicológicas de extratos de plantas, constituindo uma das avaliações farmacognósticas preliminares sob seus componentes isolados, explorando os recursos manipulados pela população para uma perspectiva da produção farmacêutica. Estudos toxicológicos realizados

in vitro encontrados na literatura reforçam a justificativa para utilização no futuro do extrato de plantas do mangue na medicina convencional (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

No teste para avaliação da atividade radioprotetora, o flavonóide isolado de EAFCe mostrou ser eficaz mediante a concentração utilizada e sua comparação com demais tratamentos conhecidos.

Dos resultados contidos na Tabela 2, destaca-se que: entre as amostras irradiadas, o percentual de células com micronúcleo foi mais elevado no grupo Doxo - doxorubicina a 2,0µg/mL - (20,7%), e foi menos elevada no grupo Flavonoide na concentração de 1,0 µg/mL (2,0%), variando de 5,7% a 6,7% nos demais grupos. Foi registrada diferença significativa entre os grupos e através de comparações múltiplas (entre pares de grupos). Comprova-se diferença significativa do grupo Doxo com cada um dos outros grupos e entre o grupo Flavonoide com cada um dos outros grupos.

Tabela 2 – Análise de micronúcleos nas amostras irradiadas com 3 Gy e submetidas a diferentes condições.

Grupo	Com micronúcleo		Sem micronúcleo		Total n
	n	%	n	%	
Controle irradiado	18	6,0 ^(A)	282	94,0	300
Controle+PHA	17	5,7 ^(A)	283	94,3	300
Doxorrubicina 2,0µg/mL	62	20,7 ^(B)	238	79,3	300
Flavonoide 1,0 µg/mL	6	2,0 ^(C)	294	98,0	300
Flavonoide 0,5 µg/mL	20	6,7 ^(A)	280	93,3	300

Obs. Letras entre parêntesis são distintas comprova-se diferenças significativas entre os pares de grupos correspondentes ao nível de 5% através de testes Qui-quadrado.

Nos Gráficos 1 e 2, é possível observar de outro modo estes resultados, a partir da comparação do percentual de células com e sem micronúcleos, nas diferentes condições. No gráfico 1, para os resultados das amostras irradiadas com 3 Gy, observa-se um aumento do percentual de células contendo micronúcleos apenas no grupo Doxo, e que o percentual de

células com micronúcleos é menor no grupo tratado com Flavonoide na concentração de 1,0 µg/mL.

No gráfico 2, observa-se que o percentual de células contendo micronúcleos foi maior apenas no grupo Doxo, nas amostras não irradiadas. Todos os demais percentuais, sejam nas amostras com fitohemaglutina ou sem, bem como nas diferentes concentrações de Flavonoide, tiveram valores próximos de percentual de células contendo micronúcleos, mostrando que o Flavonoide não induz a produção de micronúcleos.

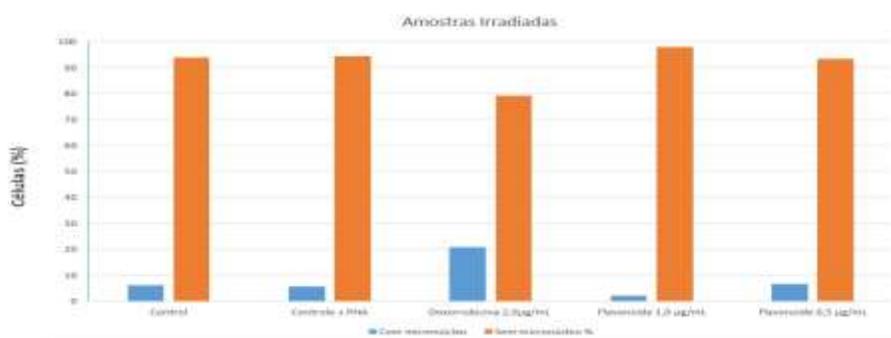


Gráfico 1: Comparação do percentual de células com e sem micronúcleos em cada grupo em diferentes condições de amostras irradiadas (3 Gy) comparado ao do controle (não irradiado).

Ao comparar este resultado com as amostras não irradiadas, a Tabela 3 mostra que o percentual de células com micronúcleo permanece mais elevado grupo Doxo (22,3%), conforme esperado, enquanto que as frequências de micronúcleos em amostras de células tratadas com flavanóides em ambas as concentrações permaneceu dentro da faixa do controle, comprovando que o Flavonoide não é mutagênico per se. Ou seja, as únicas diferenças significativas foram registradas entre o grupo Doxo com os demais grupos. Aqui se confirma a atividade do controle positivo do grupo Doxo e que o Flavonoide não tem ação mutagênica em nenhuma das concentrações testada.

Tabela 3 – Análise de micronúcleos nas amostras não irradiadas e submetidas a diferentes condições.

Grupo	Com micronúcleo		Sem micronúcleo		Total n
	n	%	n	%	
Control	8	2,7 ^(A)	292	97,3	300
Controle + PHA	11	3,7 ^(A)	289	96,3	300
Doxo 2,0µg/mL	67	22,3 ^(B)	233	77,7	300
Flavonóide 1,0µg/mL	6	2,0 ^(A)	294	98,0	300
Flavonóide 0,5 µg/mL	12	4,0 ^(A)	288	96,0	300

Obs. Letras entre parêntesis são distintas comprova-se diferenças significativas entre os grupos correspondentes ao nível de 5% através de testes Qui-quadrado.

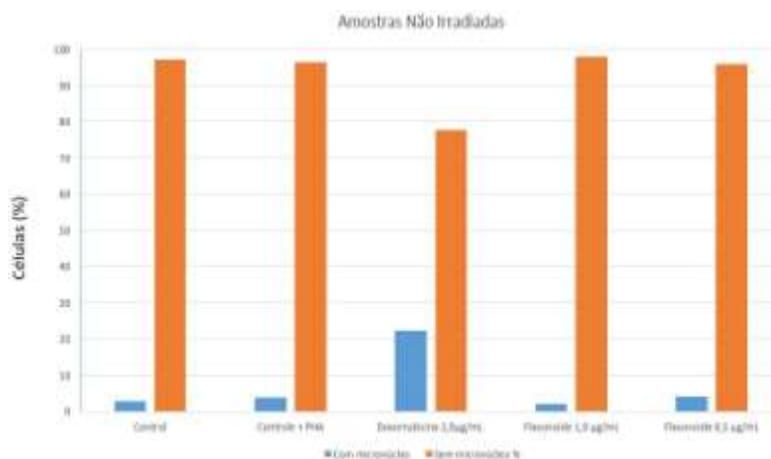


Gráfico 2: Comparação das frequências de micronúcleos em cada grupo comparadas ao controle (amostras não irradiadas).

Vale ressaltar que a estatística deste trabalho foi realizada tendo por base o número total de células (n=300 por grupo), uma vez que não se pretendia investigar a variabilidade interindividual, e sim a ação do composto per se e sua possível ação radioprotetora, tendo sido mantidas todas as outras variáveis. Este tipo análise tem por base trabalhos prévios que

utilizaram um mesmo indivíduos para fazer intercomparações metodológicas ou da ação de agentes físico-químicos (FERNANDES T. S. et al., 2008; LEMOS-PINTO et al., 2015).

A frequência (ou percentual) de micronúcleos em células foi visto, então, como um método útil na identificação de agentes clastogênicos, e da ação de substâncias radioprotetoras. De acordo com Muller (2002), o teste de micronúcleos pode ser usado para fornecer informações sobre o dano genotóxico em doses altas de radiação. Este autor relata existir pelo menos três pontos que podem auxiliar na análise: o número células mononucleadas, a proporção de células tri-tetranucleadas e a frequência média de micronúcleos.

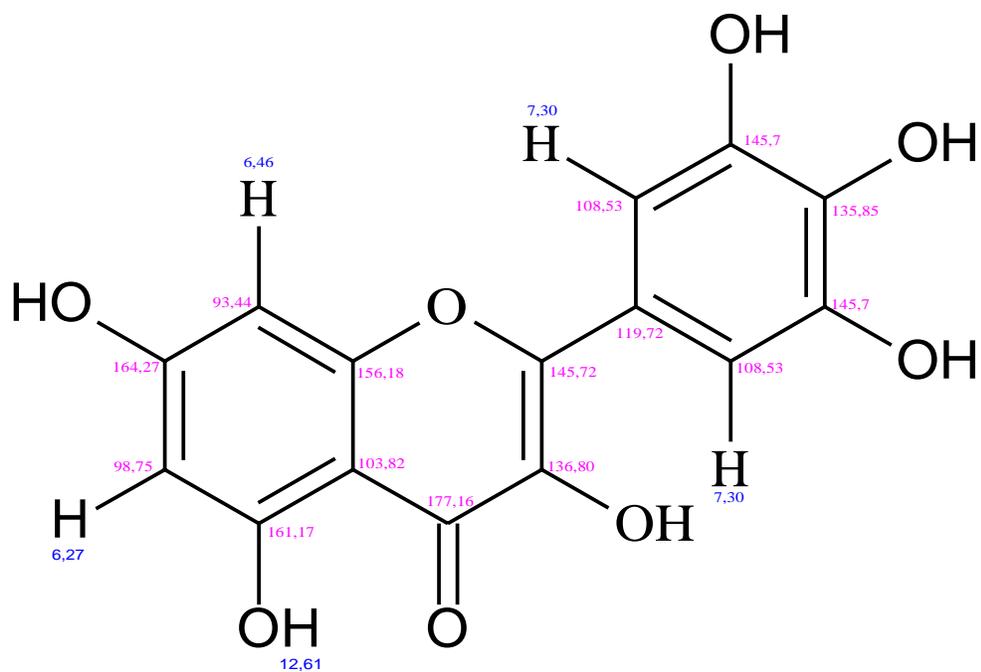
As frequências de micronúcleos indicam, com isso, se houve efeito mutagênico. A fim de evitar complicações devido à variabilidade interindividual, podem-se utilizar amostras de sangue de um único doador. Esta abordagem torna-se suficiente para o objetivo de mostrar a presença da ação genotóxica de uma dada substância ou agente físico, não levando em conta questões relacionadas à radiosensibilidade individual (MULLER, 2002).

Como visto em trabalho prévio, por Hameed et al. (2012), que avaliou a atividade antioxidante de *C. erectus*, há evidências de que as diferentes partes, as folhas, caules, frutos e flores têm propriedades antioxidante. Além disso, os compostos fenólicos são os principais componentes desta espécie.

Segundo Barros et al. (2000), os antioxidantes atuam de forma a combater os radicais livres. Diversos produtos naturais são reconhecidos por possuírem características antioxidantes, razão pela qual têm sido bastante empregados seja na conservação de alimentos ou na formulação de fármacos.

Maurya et al. (2006), relata que antioxidantes têm despertado interesse pelo seu potencial em reduzir os danos celulares causados por radiação ionizante. As várias situações de exposição humana não têm sido amplamente exploradas, e a presente pesquisa foi um esforço no sentido de buscar novas propostas que visem a radioproteção e melhoria de qualidade de vida humana diante de tais cenários, e frente ao crescente uso das radiações ionizantes em diversos setores de nossa sociedade.

4.6.3. Espectro do Flavonóide majoritário



5.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que o extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* L. possui em sua composição substâncias com potenciais propriedades radioprotetora e farmacológicas. Além disso, mostrou ser um extrato cuja atividade citotóxica apresenta taxa de viabilidade celular de 98% nas doses menos elevadas do extrato.

A atividade radioprotetora apresentou um perfil ativo-protetor, de acordo com a atuação do flavonoide majoritário na sobrevivência celular e na redução de micronúcleos. Estes achados mostraram uma concentração de segurança do flavonoide isolado de EACe e proporcionaram uma compreensão inicial da resposta radioprotetora *in vitro*.

Este trabalho experimental trouxe informações adicionais a respeito de atividades biológicas dos efeitos radioprotetores produzidos em células humanas pelo extrato aquoso das folhas de *C. erectus* L., o que consiste em dados valiosos para a compreensão do uso desta planta para fins terapêuticos.

Nossos resultados sugerem que o flavonoide majoritário isolado do EAFCE pode ser eficiente na radioproteção celular, sugerindo uma atividade antioxidante considerável. Sendo assim, estes resultados contribuem para uma base científica quanto à eficácia da sua utilização, de forma terapêutica-medicamentosa, por apresentarem o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e aplicações apropriadas.

Muito tem sido estudado a respeito das propriedades farmacológicas e dos constituintes químicos derivados do metabolismo secundário de plantas, bem como sua capacidade radioprotetora, que vem sendo utilizadas tradicionalmente, ao longo do tempo, por populações. No entanto, estes estudos não tem sido capazes de abranger todo o conhecimento sobre plantas medicinais, passado às populações ao longo dos séculos, sendo assim, ainda existem produtos naturais utilizados para fins terapêuticos, pouco ou ainda não estudados a cerca de suas atividades biológicas.

O *C. erectus* é uma planta que pode ser encontrada em diversos países, capaz de se adaptar em vários ecossistemas, como o mangue, economicamente importante para a população, fonte de energia, utilizada para fins medicinais e produção de tecnologias.

Desta forma, esta espécie, ainda pouco estudada quanto aos seus princípios ativos, atividades farmacológicas e toxicológicas e de seu potencial radioprotetor, possuem potencial de destaque para o desenvolvimento de pesquisas de novas tecnologias e terapias.

5.8. CONCLUSÕES

- O extrato aquoso de folhas de *Conocarpus erectus* (EAFCe) apresentou em sua composição 3',4'-OH flavonóides, fenilpropanoglicosídeos, saponinas, proantocianidinas, leucoantocianidinas e taninos hidrolisáveis. Apresentou ainda regiões de um cromatograma representativo de compostos não semelhantes a padrões disponíveis (absorbância de 256 nm).
- Observamos a presença de compostos fenólicos em EAFCe.
- Do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* (EAFCe), pode-se isolar flavonoide com irrelevante atividade citotóxica em linfócitos humanos expostos à radiação gama.
- O flavonoide majoritário do extrato aquoso de folhas de *C. erectus* (EAFCe) não mostrou atividade citotóxica relevante em linfócitos humanos expostos à radiação gama.
- A citotoxicidade do flavonoide isolado de EAFCe em linfócitos humanos (in vitro) apresenta-se irrelevante, com viabilidade celular > 98%.
- O dado preliminar desta pesquisa é que o flavonoide isolado de EAFCe possui efeito anti-mutagênico em linfócitos humanos (in vitro) expostos à radiação gama, não possuindo ação mutagênica per se.
- O Flavonoide majoritário na concentração de 1µg/mL foi capaz de reproduzir um espectro de RMN com carbonos definidos e ligações de hidrogênio estáveis.
- O Flavonoide majoritário na concentração de 1µg/mL foi capaz de promover uma ação antimutagênica (radioprotetora) em linfócitos humanos.

REFERÊNCIAS

AI, L.; GUR-COHEN, S.; GOLAN, K.; KAUFMANN, K. B.; ITKIN, T.; MEDAGLIA, C.; LU, X.J.; LEDERGOR, G.; KOLLET, O.; LAPIDOT, T. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. *Antioxid Redox Signal.*, V.21(11), P.1605-19, 2014.

ABDEL-HAMEED, E. S.; ABDEL, S. A. B.; SABRA, N. A. Protective effect of *Conocarpus erectus* Extracts on CCl₄-Induced chronic liver injury in mice. *Global. Jour. of Pharmacology.* v.7, p. 52-60, 2013.

ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S. A.; SHOHAYEB, M. M. RP-HPLC–UV–ESI-MS phytochemical analysis of fruits of *Conocarpus erectus* L. *Chemical papers.* V. 68, n. 10, p. 1358–1367, 2014.

ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S. A.; SHOHAYEB, M. M.; EL-SAYED, M. M.; EL-WAKIL, E. A. Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants.* v. 2, n. 2. p. 93-112, 2012.

ABREU A. C.; MCBAIN A. J.; SIMÕES M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product rep.* 2012 Sep;29(9):1007-2. Epub 2012 Jul.

AIYER, H. S.; WARRI, A. M.; WOODE, D. R.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R. Influence of Berry-Polyphenols on Receptor Signaling and Cell-Death Pathways: Implications for Breast Cancer Prevention. *J Agric Food* 2012 jun; 60(23)

ALCARAZ, M. J.; CARVALHO, J. C. T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. IN: CARVALHO M. J. C. T. *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.* RIBEIRÃO PRETO, SP–TECMEDD. P.79-97, 2004.

AL-HUMAID, A. I.; MOFTAH, A. E.; Effects of hydrophilic polymer on the survival of buttonwood seedlings grown under drought stress. *J. OF PLANT NUTRIT.* V. 30, N. 1, P.53- 66, 2014.

ALVES T. M.; SILVA A. F.; BRANDÃO M.; GRANDI T. S. M.; SMÂNIA E.; SMÂNIA JUNIOR A.; ZANI C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Men Inst Oswaldo Cruz* 2000 may/jun; 95 (3).

AMARAL, A. Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection.; *Brazilian Archives of Biology and Technology.* vol.48 no.spe 2 Curitiba Oct. 2005.

ARORA, R.; CHAWLA, R.; PURI, S. C.; SAGAR, R.; SINGH, S.; KUMAR, R.; SHARMA, A. K.; PRASAD, J.; SINGH, S.; KAUR, G.; CHAUDHARY, P.; QAZI, G. N.; SHARMA, R. K. Radioprotective and antioxidant properties of low-altitude *Podophyllum hexandrum* (LAPH). *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 24(4):299-314. 2005.

ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free radical biology and medicine*. V. 20, N. 5, P. 675-705, 1996.

Au W. W. & RUCHIRAWAT M., Biomarkers in population studies: environmental mutagenesis and risk for cancer. *Rev environ health*. Apr-Jun;24(2):117-27. 2009.

AYOUB, N. A. A Trimethoxyellagic Acid Glucuronide From *Conocarpus Erectus* Leaves: Isolation, Characterization And Assay Of Antioxidant Capacity. *Pharmaceutical Biology*, 48, 328-332; 2010.

ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. *Vivências: Rev. Elet. Exten. da URI*, v.7, n.12, p.51-60, 2011.

AZZAM E. I., JAY-GERIN J. e PAIN D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*. 2012 Dec 31; 327(0): 48-60 / Published online 2011 Dec 17. doi:10.1016/j.canlet.2011.12.012

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS S. J.; DAS, D. K.; RAY, S. D.; KUSZYNSKI, C. A.; JOSHI, S. S.; PRUESS, H. G. Free Radicals And Grape Seed Proanthocyanidin Extract: Importance In Human Health And Disease Prevention. *Toxicology*. Aug 7;148(2-3):187-97. 2000.

BANDEIRA, A. R. G. Estudo fitoquímico e a atividade biológica de *Conocarpus erectus* L. (Mangue Botão). 2003. 92 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE. 2003.

BARROS, H. M.; ESKINNAZI-LEÇA, E.; MACEDO, S. J.; LIMA, T. Gerenciamento Participativo De Estuários E Manguezais. Recife: Ed. Universitária Da UFPE, P 240. 2000.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. *Alimentos e Nutrição*. V. 15, N. 3, P. 285-292, 2004.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity, V. 56(15), P. 185-205, 2008.

BENKOVIĆ, V.; HORVAT-KNEŽEVIĆ, A.; ĐIKIĆ, D.; LISČIĆ, D.; ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I.; KOSALEC, I.; KOPJAR, N. Radioprotective Effects Of Propolis And Quercetin In Γ -Irradiated Mice Evaluated By The Alkaline Comet Assay. *Phytomedicine*. V. 15, Pg. 851-858, 2008 B.

BERGER, U.; ADAMS, M.; GRIMM, V.; HILDENBRANDT, H. Modelling secondary succession of neotropical mangroves: Causes and consequences of growth reduction in pioneer species. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, Vol. 7, Issue 4, 16, Pg. 243–252, 2006.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.*; 5(1): 9–19, 2012.

- BITELLI, T. Física E Dosimetria Das Radiações. 2a Ed. 442 P. São Paulo: Atheneu, 2006.
- BLADEN, C. L.; KOZLWSKI, D. J.; DYNAN, W. S. Effects Of Low-Dose Ionizing Radiation And Menadione, An Inducer Of Oxidative Stress, Alone And In Combination In A Vertebrate Embryo Model. *Radiation Research*, 178(5):499–503. 2012.
- BONASSI, S. & AU, W. W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res.*, 511, 73-86, 2002.
- BOWSHER, C. S.; TOBIN, M. *Plant Biochemistry A*. New York: Garland Science, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 26, de 13 de Maio de 2014. Dispõe Sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o Registro e A Notificação De Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Agência Nacional De Vigilância Sanitária, 2014. Acesso em: Jan. 2016, 2017. Disponível Em: [Http://Bvsmms.Saude.Gov.Br/Bvs/Saudelegis/Anvisa/2014/Rdc0026_13_05_2014.Pdf](http://Bvsmms.Saude.Gov.Br/Bvs/Saudelegis/Anvisa/2014/Rdc0026_13_05_2014.Pdf).
- BROOKS, A. L.; HOEL D. G.; PRESTON, R. J. The role of dose rate in radiation can cer risk: evaluating the effect of dose rate at the molecular, cellular and tissue levels using key events in critical pathways following exposure to low LET radiation. *Int J Radiat Biol*. 92(8): 405–426. 2016.
- BARTZ, M. C.; JÚ NIOR, J. C. F. M.; LARCHER. L. Variaç ão morfológica de *Laguncularia racemose* (L.) C. F. Gaertn. (Combretaceae) em áreas de manguezal e de transiç ão entre manguezal e floresta de restinga. *Biotemas*. v.28, n. 1, p. 21-29, 2015.
- BURANELLI, R. C. Variabilidade populacional em manguezais: análises moleculares e morfológicas em caranguejos *Brachyura* (Crustacea: Decapoda). 2016. 188 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Comparada), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto. 2016.
- CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO A. M. & CALATRONI A. Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6: 1311-1320. 2006
- CASELLI, A.; CIRRI, P.; SANTI, A.; PAOLI, P. Morin: A Promising Natural Drug. *Current Medicinal Chemistry*, V. 23(8):pg.774-91, 2016.
- COMPEAN K. L.; *Antimicrobial Activity of Plant Metabolit Secondary*.
- CAVALLI, G. Chromosome kissing. *Curr Opin Genet Dev*. 17(5):443-50, 2007. *Journal medicinal plant* 2014. INSS 1819-3455
- CITRIN D., COTRIM A., Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Oncologist*. 2010 Apr; 15(4): 360–371.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. V.72, Pg.1–20, 2013.

COCK I. E. The Genus Aloe: Phytochemistry and Therapeutic Uses Including Treatments for Gastrointestinal Conditions and Chronic Inflammation. *Prog Drug Res*.v.70, pg.179-235. 2015.

COY, S.L.; CHEEMA, A.K.; TYBURSKI, J.B.; LAIAKIS, E. C.; COLLINS, S. P.; FORNACE A JR. Radiation metabolomics and its potential in biodosimetry. *Int J Radiat Biol*. V. 87(8):802-23. 2011.

CRUZ, M. Z. A integração da Medicina Complementar e Alternativa em Sistemas de Saúde Convencionais. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado – Ciências Biológicas - Modalidade Médica), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, 2008.

CHEN, X. M.; TAIT, A. R.; KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, v.218, p. 15-21 2016

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os Metabólitos Secundários E Sua Importância Para O Organismo. *Diversitas Journal*. V.1, N.2, P.175-181, 2016.

DIAS, A. D.; URBAN, S. & ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolite*, v.2, pg. 303- 336, 2012.

DMITRY B. Z., MAGDALENA J., e STEVEN J. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev*. 2014 Jul; 94(3): 909–950.doi: 10.1152.00026.2013

DOLAN, M. The role of the Giemsa stain in cytogenetics. *Biotech Histochem*. V.86(2):94-7, 2011.

DOWD, S. B.; TILSON, E. R. *Practical Radiation Protection and Applied Radiobiology*. 2a Ed. Philadelphia: Saunders Company, 1999.

DRAGOVIC-UZELAC, V.; LEVAY, B.; BURSAC, D.; PETDISIC, I. & BSKO, A. Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agriculture Conspectus Scientifics*, v. 72, pg. 279-284, 2007.

DUTTA, U. R. The history of human cytogenetics in India-A review. *Gene*. Volume 589, Issue 2, pg. 112–117, 2016.

DESOUKY O., DING N., ZHOU G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Science* Volume 8, Issue 2, April 2015, Pages 247- 254 <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>

EDOUARD, I.; AZZAM.; JEAN-PAUL.; JAY-GERIN.; AND DEBKUMAR PAIN. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Published, Vol. 327, Issues 1–2, 31, Pages 48–60, December 2012.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* vl. 4, pg. 177, 2013.

ERIC, S.; GIL.; RENÉ, O.; COUTO. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications¹. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* V. 23, Issue 3, pg. 542- 558, 2013.

FARAH, C. S.; BHATIA, N.; JOHN, K.; LEE, B. W. Minimum intervention dentistry in oral medicine. *Australian Dental Journal*, v. 58:(1 Suppl): 85–94, 2013.

FERNANDES, T. S. Emprego das Aberrações Cromossômicas Instáveis e Micronúcleos no Biomonitoramento Individual: Estudo Comparativo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Energética e Nucleares (Proten), 2005.

FESTING, M. F. Improving toxicity screening and drug development by using genetically defined strains. *Methods Mol Biol.* V. 602, pg.1-2, 2010.

FERNANDES et al., A comparison of different cytological stains for biological dosimetry

FILHO, D. W.; SILVA, E. D. D. A.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. in: *Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal.* Chapecó: argos. P.317-334, 2001.

FILHO, M. B.; FILHO, S. D. S.; MOURA, E. G.; MAIWORM, A. I.; ORLANDO, M. M. C.; PENAS, M. E.; CARDOSO, V. N.; BERNARDO, L. C.; BRITO, L. C. Drug interaction with radiopharmaceuticals: a review 1. *Braz. arch. biol. technol.* vol.48 no.spe2, 2005.

FOWLER, B. A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* V. 238, pg. 294-300, 2009.

FREIRE, A. M. S.; MONTEIRO, R. J. S.; OLIVEIRA, J. F.; RANDAU, K. P. Prática popular de saúde: a concepção dos usuários da unidade de saúde engenho do meio sobre o uso de plantas medicinais. *Rev. APS.* V. 18, N. 2, P. 205-212, 2015.

GAVELOVÁ, M.; HLADÍKOVÁ, J.; VILDOVÁ, L.; NOVOTNÁ, R.; VONDRÁČEK, J.; KRČMÁR, P.; MACHALA, M.; SKÁLOVÁ, L. Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma mcf-7 cells. *Chemico-biological interactions.* V. 176, P. 9-18, 2008.

GRUNDMANN, O.; MITCHELL, G. C.; LIMESAND, K. H. Sensitivity of Salivary Glands to Radiation from Animal Models to Therapies. *J dentres.* V. 88, pg. 894–903, 2009.

GEORGAKIL, A. S. Bystander and non-targeted effects: A unifying model from ionizing radiation to cancer. *Cancer Lett.* 2015 Jan 1;356(1):3-4. Epub 2014 Apr 2. 2014.

GIRIL, C. & MUHLHAUSEN, J. Mangrove Forest Distributions and Dynamics in Madagascar (1975–2005). *Sensors (Basel)* v.8 (4); pg. 2104-2117, 2008.

GLASER, M. Interrelations between mangrove ecosystem, local economy and social sustainability in Caeté Estuary, north Brazil. *Wetlands Ecology and Management*, v.11, pg.265- 272, 2003.

GORDON, M. C. and DAVID, J. N. Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, V. 1830, Issue 6, pg. 3670-3695, June 2013.

GUO, J. J.; HSIEH, H-Y.; HU, C-H. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: a theoretical study. *Journal Physical Chemistry B*. v. 113, pg. 15699–15708, 2009.

HADDAD, J. J. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immunopharmacoredox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol*.v.4 (4), pg.475-93, 2004.

HALBWIRTH, H. The creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *Int J Mol Sci*, v.11(2), pg. 595–621. 2010.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 40a Edition; Oxford University Press; pg. 268–340. 2007.

HAMEED, E. S. A.; BAZAID, S. A. & SABRA, A. N. A. Protective Effect of *Conocarpus Erectus* Extracts on CCL4-Induced Chronic Liver Injury In Mice. *Global J. Pharmacol*. V.7, pg. 52-60, 2013.

HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY (HILIC): STATE OF THE ART AND APPLICATIONS. Carla Grazieli Azevedo da Silva Carla Beatriz Grespan Bottoli Carol H. Collins

HARTWIG, V.; GIOVANNETTI, G.; VANELLO, N.; LOMBARDI, M.; LANDINI, L. & SIMI, S. Biological Effects and Safety in Magnetic Resonance Imaging: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.6 (6), pg.1778-1798. 2009.

HAZELDEN K. P. The developmental toxicity testing of biologics. *Methods Mol Biol*. V. 947. Pg.31-36, 2010.

IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res*. V.658(3), pg. 215-33. 2008 Mar-Apr, Epub 2007 Oct 22.

ICRP de 2012, contém a melhor definição de radioprotetores, radiomitigadores e agentes terapêuticos *Quím. Nova* vol.39 no.2 São Paulo Feb.2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160003>

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Scientific and Technical Publications. Vienna, 2011.

JO, C.; JEONG, S.; KIM S., PARK, E.; LEE, S. Effect of irradiation on the antioxidative and antigenotoxic activities of a green tea leaf and stem extract. *Inter. J. Food Sci. Tech*, v. 43 p. 400–405, 2008.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicology Letters*, V. 132, pg. 19–25, 2002.

JAJTE, J.; ZMYŚLONY, M.; PALUS, J.; DZIUBAŁTOWSKA, E.; RAJKOWSKA, E. Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7 mT 50 Hz magnetic field- induced DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat Res*, V. 483 (1-2), pg. 57-64, 2001.

JAJTE, J.; ZMYSLONY, M. & RAJKOWSKA, E. Protective effect of melatonin and vitamin E against prooxidative action of iron ions and static magnetic field. *Med Pr*, V. 54(1): pg. 23-28, 2003.

JAL-HUMAID, A.I.; MOFTAH, A.E. Effects of hydrophilic polymer on the survival of buttonwood seedlings grown under drought stress. *J. of Plant Nutrit.* V. 30, N. 1, P.53-66, 2006.

KAMALY N.; XIAO, Z.; VALENCIA, P. M. ; RADOVIC-MORENO, A. F.; FAROKHZADA, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, Published online, 2012.

KANDASAMY, K. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems Article (PDF Available) in *Advances in Marine Biology, Reads*, V. 40, P. 81-251, 2001.

KANNAN, T. P.; & ZILFALIL, B. A. Cytogenetics: Past, Present And Future. *Oxid Med Cell Longev.* V. 2(5): 270–278, 2009.

KASOTE, D. M.; HEGDE, M.V.; KATYARE, S. S. Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy. *Biofactors*, V. 39(4), pg. 392–406. 2013.

KASOTE, D. M.; KATYARE, S. S.; HEGDE, M.V.; BAE, H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *Biol Sci*, V. 11(8), pg. 982– 991, 2015.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, V. 40, P. 81-251, 2001.

KAUR P. & ASE A. Radiation-induced effects and the immune system in cancer. *Front Oncol.* v.2, pg.191. 2012.

KAUSAR, A.; GIRI. S.; MAZUMDAR, M.; GIRI, A.; ROY, P.; DHAR, P. Micronucleus and other nuclear abnormalities among betel quid chewers with or without sadagura, a unique

smokeless tobacco preparation, in a population from North-East India. *V.677(1-2)*, P.72-5, 2009.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in nutrition: an international review journal.*, V.2, N. 1, P. 32-50, 2011.

KHALIGHI-SIGAROODI, F.; AHVAZI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; TAGHIZADEH, M.; YAZDANI, D.; & S .BIDELE, F. Cytotoxicity and Antioxidant Activity of 23 Plant Species of Leguminosae Familya. *Iran J Pharm Res.* 2012 Winter; 11(1):295–302.

KIM, B. M.; HONG, Y.; LEE, S.; LIU, P.; LIM, J. H.; LEE, Y. H.; LEE, T. H.; CHANG, K. T. & HONG, Y. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* V.16(11), pg. 26880-26913, 2015.

KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, V.16(1), P.51-8, 2001.

KITTS, D. D.; HU, C. Efficacy And Safety of Ginseng. *Public Health Nutrition.* V. 4, P. 473– 485, 2000 B. 1.

KITTS, D. D.; WIJEWICKREME, A. N.; HU, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract, *Molecular and Cellular Biochemistry*, V.203, pg. 1–10, 2000.

KOIDE, K.; OSMAN, S.; GARNER, A. L.; SONA, F.; DIXON, T.; GREENBERGER, J. S.; EPPERLY, M. E. The use of 3, 5, 4'-tri-o-acetylresveratrol as a potential pro-drug for resveratrol protects mice from-irradiation-induced death. *ACS, Medicinal Chemistry Letters.* V. 2, N. 4, P.270-274, 2011.

KONOPACKA, M.; RZESZOWKA-WOLNY, J. Antioxidant vitamins c, e and b7 carotene reduce dna damage before as after y-ray irradiation of human lymphocytes in vitro, *MUTATION RESEARCH*, V.491, pg. 1-7, 2001.

KOUKOURAKIS, M. D. Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. *Br J Radiol.* v.85(1012); pg.313–330, 2012.

KRAMER-MAREK, G.; CAPALA, J. The role of nuclear medicine in modern therapy of cancer. *Tumor Biology.*, V. 33, P. 629-640, 2012.

KREJCI L.; ALTMANNOVA, V.; SPIREK, M.; ZHAO, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, V.40, P. 5795-5818, 2012.

KUMAR, S. & PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, V.2013(2013), Article ID 162750.

LECCIA, M. T.; RICHARD, M. J.; BEANI, J. C.; ET AL. Protective effect of selenium and zinc on uv – a damage in human skin fibroblasts. *Photochemistry and photobiology*, V. 58, P. 548–553, 1993.

LIU, B.; BIAN, H. J.; BAO, J. K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett.* v. 1, n. 1, p. 1-12, 2010.

LEE, T-K.; KEVIN, F.; O'BRIEN.; WANG, W.; ROBERTA, M.; JOHNKE.; SHENG, C.; SIDI, M.; BENHABIB.; WANG, T.; RON, R.; ALLISON. Radioprotective effect of american ginseng on human lymphocytes at 90 minutes postirradiation: a study of 40 cases. *The journal of alternative and complementary medicine.*, V. 16, N. 5, P.561-567, 2010.

LEE, T-K; JOHNKE, R. M.; ALLISON, R. R.; O'BRIEN, K. F.; DOBBS, L. J. J. Radioprotective potential of ginseng. *Mutagenesis*, V. 20 (4): P. 237-243, 2005.

LINSINGEN, L. V.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família Combretaceae. *Brown na região sul do Brasil. Acta Bot. Bras.* V.23, N;3, P.738-750, 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn Rev.* Jul-Dec, V. 4(8), P. 118–126, 2010.

LUZHNA, L; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet.*, V 4, P. 131, 2013.

LICASTRO F.; CANDORE G.; LIO D.; PORCELLINI E.; CARUSO C. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases *Immun Ageing*. 2005; Published online 2005 May

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immunity. *New Engl. J. Med.* v. 3, n. 5 p.338- 344, 2000.

MANDA, K.; KAVANAGH, J. N.; BUTTLER, D.; PRISE, K. M.; HILDEBRANDT, G. Low dose effects of ionizing radiation on normal tissue stem cells, *Mutat Res.*, 2014.

MARCU, L. G. The role of amifostine in the treatment of head and neck cancer with cisplatin-radiotherapy. *European journal of cancer care.*, V. 18, P. 116-123, 2009.

MARTINS, M. C.; GARLET, T. M. B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. *Rev. Elet. Gest., educ. E tecn. Amb.* V.20, N. 1, P.438-448, 2016.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T.P.; NAIR, C.K. Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effect of natural products. *Indian J Exp Biol*, V.44, P.93- 114, 2006.

MEHER, P. K; MISHRA, K. P. Radiation oxidative stress in cancer induction and prevention, 2017.

MENEZES, M.; MACHADO, P.; BERGER, U.; MEHLIG, U. Mangrove vegetation in Amazonia: a review of studies from the coast of Pará and Maranhão States, north Brazil. *Acta Amaz.* vol.38 no.3, 2008.

MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (ORGS). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: editora da ufrgs; florianópolis: editora da ufsc, 1104P.2010.

MITCHELL, J. B.; RUSSO, A.; KUPPUSAMY, P.; KRISHNA, M. C. Radiation, radicals and images. *Annals of the new york academy of sciences*.V. 899, P. 28-43, 2000.

MODRIANSKY, M.; TYURINA, Y. Y.; TYURIN, V. A.; MATSURA, T.; SHVEDOVA, A. A.; YALOWICH, J. C.; KAGAN, V. E. Anti-/pro-oxidant effects of phenolic compounds in cells: are colchicine metabolites chain-breaking antioxidants? *Toxicology*.V.1;177(1):105-17,2002.

MONTONO, A.; BARQUINERO, J. F.; ALMONACID, M.; MONTONO, A.; SEBASTIÀ, N.; VERDÚ, G.; SAHUQUILLO, V.; SERRANO, J.; SAIZ, M.; VILLAESCUSA, J. I.; SORIANO, J. M. Concentration-dependent protection by ethanol extract of propolis against γ - ray induced chromosome damage in human blood lymphocytes. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011.

MOORE, T. L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. R.; HIRSCH, V.; BALOG, S.; URBAN D.; JUD, C.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; LATTUADA, M.; PETRI-FINK, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. (Review Article) *Chem. Soc. Rev.*, v. 44, P. 6287-6305, 2015.

MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, F.; DAJAS, F. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('marcela'). *Phytotherapy Research.*, V.19, P.486-490, 2005.

MOUKETTE, B. M.; PIEME, C. A.; NJIMOU, J. R.; BIAPA, C. P.; MARCO, B.; NGOGANG, J. Y. In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: *Monodora myristica*. *Biol Res*. V.14; 48:15, 2015.

MÜLLER W. U., et al., *Mutation Research* 502 (2002) 47

NAGARAJAN, M.; RAJASEKARAN, S. & GANESH, S. K. Antibacterial activity of *lawsonia inermis* L. *Int. J. Modern Biol. Med.*, 4, 169-175, 2013.

NAKAMURA, A.; ITAKI, C.; SAITO, A.; YONEZAWA, T.; AIZAWA, K.; HIRAI, A.; SUGANUMA, H.; MIURA, T.; MARIYA, Y.; HAGHDOOST, S. Possible benefits of tomato juice consumption: a pilot study on irradiated human lymphocytes from healthy donors. *Similar articles Nutr J*.v.16(1), Pg. 27, 2017.

NAMBIAR, D.; RAJAMANI, P.; SINGH, R. P. Effects Of Phytochemicals On Ionization Radiation-Mediated Carcinogenesis And Cancer Therapy. *Mutation Research*. V. 728, Pg.139- 157, 2011.

NASCIMENTO, D. K. D.; SOUZA, I. A.; OLIVEIRA, A. F. M.; BARBOSA, M. O.; SANTANA, M. A. N.; JÚNIOR, D. F. P.; LIRA, E. C.; VIEIRA, J. R. C. Phytochemical Screening And Acute Toxicity Of Aqueous Extract Of Leaves Of *Conocarpus Erectus* Linnaeus In Swiss Albino Mice. *Acad. Bras. Ciênc*. V.88, N.3, Pg.1431-1437, 2016.

NATARAJAN, A. T.; BERNI, A.; MARIMUTHU, A. M.; PALITTI, F. The type and yield of ionising radiation induced chromosomal aberrations depend on the efficiency of different DSB repair pathways in mammalian cells. *Mutation research*. v. 642, p. 80-85, 2008.

NETTEL, A.; DODD, R. S.; CID-BECERRA, J. A. & ROSA-VELEZ J. D. L. Ten New Microsatellite Markers For The Buttonwood Mangrove (*Conocarpus Erectus* L., Combretaceae). *Molecular Ecology Resources*. V.8, pg.851-853, 2008.

NAGEM, T.J; DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. Ouro Preto, MG, Brasil. v. 28, n.3, p. 241- 249. 2007.

NICOLETTI, M. A.; CARVALHO, K. C.; OLIVEIRA, J. R. M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSSI, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Popular use of medicines containing drugs from vegetal source and/or medicinal plants: main interactions resulting from that. *Revista Saúde – UNG*, v.4 n.1, 2010.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. *Acidente radiológico de Goiânia*. *Estud. av.* Vol.27 no.77 São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, H. B.; KFFURI, C. W.; CASALI, V. W. D. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosario da Limeira, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, pg.256-260. 2010.

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0114137 December 2, 2014

PISOSCHI A. M.; NEGULESCU G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Pisoschi and Negulescu, Biochem & Anal Biochem* 2011, 1:1

PANNKUK, E. L.; FORNACE, A. J.; LAIAKIS, E. C. Metabolomic applications in radiation biodosimetry: exploring radiation effects through small molecules. *International Journal of Radiation Biology*. Pg. 1-26 | Received 27 Oct 2016, Accepted 01 Dec 2016.

PRABHAKAR, K. R.; VEERAPUR, V. P.; BANSAL P.; PARIHAR, V. K.; KANDADI M. R.; PRIYADARSINI, K. I.; UNNIKRIISHNAN, M. K. Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract, V.165, P.22-32, 2007.

PENIDO, A. B.; MORAIS, S. M.; RIBEIRO, A. B.; SILVA, A. Z. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. 1. *Acta Amaz.* vol. 46, no 4, 2016.

PANDEY K. B. e RIZVI S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Nov-Dec; 2(5): 270–278.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A Review Of The Antioxidant Mechanisms Of Polyphenol Compounds Related To Iron Binding. *Cell Biochemistry And Biophysics.*, V.53 P. 75–100, 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Vegetable Secondary Metabolites and Antioxidants Benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, V.3, N. 4, P.146–152, 2012.

PICKENS, L. B.; TANG, Y & CHOOI, Y-H. Metabolic Engineering for the Production of Natural Products. *Annu Rev Chem Biomol Eng.*; v.2:211–236. 2011.

PONTUAL, M. L. A.; DOMINGOS, A. C.; ALMEIDA, S. M. A Importância dos radioprotetores na vida cotidiana. *Revista de ciência educação e cultura.*, 2004. 1-5 P. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. V.18;63:377-88, 2009.

PELLMAR T. C. & ROCKWELL S. Priority list of research areas for radiological nuclear threat countermeasures. *Radiat Res.* 2005;163:115–123.

RAJAGOPALAN, R.; WANI, K.; HUILGOL, N. G.; KAGIYA, T. V.; NAIR, C. K. Inhibition of gamma-radiation induced dna damage in plasmid pbr322 by tmg, a water-soluble derivative of vitamin e. *Journal of radiation research.*, V. 43, P. 153–159, 2002.

RANA, S.; KUMAR, R.; SULTANA, S. & SHARMA, R. K. Radiation-induced biomarkers for the detection and assessment of absorbed radiation doses. *J Pharm Bioallied Sci.* v. 2(3):189-96, 2010.

RAWAT, P.; SINGH, P. K.; KUMAR, V. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *Journal of Herbal Medicine.* v. 6, n. 3, p. 107-118, 2016.

RASOANAIVO, P.; WRIGHT C. W.; WILLCOX, M. L.; & GILBERT, B. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J.* 2011; 10 (Suppl 1): S4. Published online 2011.

RAZA, M.A.; ANWAR, F.; SHAHWAR, D.; MAJEED, A.; MUMTAZ, M.W.; DANISH, M.; NAZAR, M.F.; PERVEEN, I.; KHAN, S.U. Antioxidant and Antiacetylcholine Esterase Potential of Aerial Parts of *Conocarpus Erectus*, *Ficus Variegata* and *Ficus Maclellandii*. *Pak. J. Pharm. SCI.* V.29, N. 2, P. 489-495, 2016

REISZ, J. A.; BANSAL, N.; QIAN, J.; ZHAO, W. & FURDUI, C. M. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal.* V.10; 21(2): 260–292, 2014.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagêneses ambiental*. 1. Ed. Canoas: ED. ULBRA. 355P.,2003.

RICARDO, K. F. S.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; OLIVEIRA M. G. A. & SOARES, J. F. Effect of Flavonoids Morin; Quercetin and Nicotinic Acid on Lipid Metabolism of Rats Experimentally Fed with Triton. *Braz. arch. biol. Technol.* Vol.44 no.3 Curitiba Sept. 2001

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials research.* V.6, N. 3, P.317-320, 2003.

ROGERO, S. O.; SAIKI, M.; CRUZ, A. S.; COSTA, I. Estudo da citotoxicidade de elementos de ligas metálicas utilizadas como biomateriais. 17 O CBECIMAT - Congresso Brasileiro De Engenharia E Ciência Dos Materiais, Foz Do Iguaçu, PR, 73 Brasil. 2006. Acesso em: jan.2017. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br:8080/xmlui/handle/123456789/18517>

SABHARWAL, R.; VERMA, P.; SYED, M. A.; SHARMA, T.; SUBUDHI, S. K.; MOHANTY, S.; & GUPTA, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol.*; v. 36(4): 212–218, 2015.

SHARMA, A.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of methanol extract of *Adansonia digitata* L. *Trop. J. Pharm. Res.* v. 15, n. 9, p. 1923-1927, 2016

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H.. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. V.1;177(1):67-80, 2002.

SALEEM, M.; NASEER, F. Medicinal plants in the protection and treatment of liver diseases. *Bangladesh Journal of Pharmacology.*; V. 9, No 4, 2014.

SANKARANARAYANAN, K. Estimation of the genetic risks of exposure to ionizing radiation in humans: current status and emerging perspectives. *Journal of radiation research.*, V. 47, (SUPPL B): P. 57-66, 2006.

SATYAMITRA, M.; DEVI, P. U.; MURASE, H.; KAGIYA, V. T. In vivo radioprotection by alpha-TMG: preliminary studies. *Mutat Res.* V.8;479(1-2):53-61, 2001.

SEGRETO, H. R.; COMODO.; SEGRETO, R. A. Radiobiology review and update: cellular, molecular and clinical aspects. *Folha médica*. V. 119, N. 4 P.9-27, 2000.

SHAH, S. M.; SADIQ, A.; SHAH, S. M.; ULLAH, F. Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. *BMC Complement Altern Med.* V.3;14:181, 2014.

SHAHNEH, F. Z.; VALIYARI, S.; BARADARAN, B.; ABDOLALIZADEH, J.; BANDEHAGH, A.; AZADMEHR, A.; & HAJIAGHAEI, R. Inhibitory and Cytotoxic Activities of *Salvia Officinalis* L. Extract on Human Lymphoma and Leukemia Cells by Induction of Apoptosis. *Adv Pharm Bull.* V.3(1):51-5, 2013.

SHOHAYEB, M.; HAMEED, E. A. & BAZAID, S. Antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of *Conocarpus erectus* L. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 3, 544-553, 2013.

SIMÃO ES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2a Edição. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. *Rev. Elet. Gest., educ. E tecn. Amb.* V.20, N. 1, P. 381-388, 2016.

SILVA, M. R. O. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de vila velha, itamaracá-PE. 2004. 49 f. Dissertação (pós-graduação em biologia de fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, RECIFE. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (ORGS). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 1104 P, 2010.

SMEETS, D.F. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem*. V.37(6):439-46, 2004.

SPAGNUOLO, C.; RUSSO, M.; BILOTTO, S.; TEDESCO, I.; LARATTA, B.; RUSSO, G. L. Dietary polyphenols in câncer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Annals of the new york academy of sciences*. V. 1259, P.95-103, 2012.

SZATMÁRI, T.; KIS, D.; BOGDÁNDI, E. N.; BENEDEK, A.; BRIGHT, S.; BOWLER, D.; PERSA, E.; KIS, E.; BALOGH, A.; NASZÁLYI, L. N.; KADHIM, M.; SÁFRÁNY, G.; & LUMNICZKY, K. Extracellular Vesicles Mediate Radiation-Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen. *Front Immunol*.v.27;8:347, 2017.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, K.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, T. Analysis of death pattern in cancer cells by using different kinds of LET radiation. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*. V.;62(10):531-4, 2002.

TEIXEIRA, A. H.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; VAL, D. R.; FILHO, S. M. P.; SILVA, A. A. R. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. *Sanare*. V. 13, N. 1, P. 23-28, 2014.

TIWARI, P.; KUMAR, A.; BALAKRISHNAN, S.; KUSHWAHA, H. S.; MISHRA, K. P. Radiation-induced micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes and their prevention by antioxidant thiols. *Mutat Res*. V.31;676(1-2): 62-8, 2009.

TORGOVNICK, A.; & SCHUMACHER, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet*. V.6: 157, 2015.

TORRAS-CLAVERIA, L.; JÁUREGUI, O.; CODINA, C.; TIBURCIO, A. F.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. *Plant Science, Limerick*, n. 182, p. 71-78, 2012.

UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on The Effects of Atomic Radiation). *Sources and Effects of Ionizing Radiation*. Volume li. 2008 Report to The General Assembly With Annexes., (New York: United Nations), 2011.

UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; KOLLANOOR-JOHN, A.; VENKITANARAYANAN, K. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. *Biomed Res Int*. v.2014: 761741, 2014.

USHAKOV, V. L.; ALIPOV, E. D.; SHCHEGLOV, V. S.; BELIAEV, I.A. The effects of the microwaves on E. coli cells depend on oxygen concentration and static magnetic field. *Radiats Biol Radioecol*. V.46(6):729-34, 2006.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* V.10;160(1):1- 40, 2006 Mar. Epub 2006 Jan 23.

VASI, S.; & AUSTIN, A. Antioxidant potential of eugenia jambolana lam. Seeds. *J. BIOL. SCI.*, v.9, pg.894-898, 2009.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, p. 1-7, 2006.

WIDEŁ, M.; PRZYBYSZEWSKI, W.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. Radiation-induced bystander effect: the important part of ionizing radiation response. Potential clinical implications.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, V. 29, N. 20, P. 2941–2953, 2008.

ZANG, R.; ZHANG, X.; SUN, J.; YANG, S. T. In vitro 3-d multicellular models for cytotoxicity assay and drug screening. *Process biochemistry.* V.51, N. 6, P.772-780, 2016.

ZHENG, Y. F.; ZHANG, Q.; LIU, X. M.; MA, L.; LAI, F. Extraction of polysaccharides and its antitumor activity on magnolia kwangsiensis figlar & root. *Carbohydrate polymers.* V. 142, P. 98–104, 2016.

ZOU, Y. F.; BARSETT, H; HO, G. T. T.; INNGJERDINGEN, K. T.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T. E.; PAULSEN, B. S. Immunomodulating pectins from root bark, stem bark, and leaves of the Malian medicinal tree Terminalia macroptera, structure activity relations. *Carbohydrate Research.* v. 403, p. 167-173, 2015.

ZHOU, D.; SHAO, L.; & SPITZ, D. R. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv Cancer Res.* 2014; 122: 1–67.