

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES – PROTEN

***ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR O EFEITO RADIOPROTETOR DA
MOMORDICA CHARANTIA L.***

SÍMEY DE SOUZA LEÃO PEREIRA MAGNATA

**RECIFE
2007**

**ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR O EFEITO RADIOPROTETOR DA
*MOMORDICA CHARANTIA L.***

SÍMEY DE SOUZA LEÃO PEREIRA MAGNATA

***ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR O EFEITO RADIOPROTETOR DA
MOMORDICA CHARANTIA L.***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Aplicação de Radioisótopos.

ORIENTADOR: PROF^a Dr^a MARIA TERESA JANSEM DE ALMEIDA CATANHO

**RECIFE
2007**

M196e

Magnata, Simey de Souza Leão Pereira.

Ensaio biológico para avaliar o efeito Radioprotetor da Momordica Charantia L. / Simey de Souza Leão P. Magnata.- Recife: O Autor, 2007.

iii, 66 folhas, il : figs., tabs.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Energia Nuclear. 2. Radioprotetor. 3. Momordica Charantia
4. Radiofarmácia. I. Título.

UFPE

621.042

CDD (22. ed.)

BCTG/2007-139

**ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR O EFEITO
RADIOPROTETOR DA MOMORDICA CHARANTIA L.**

Simey de Souza Leão Pereira Magnata

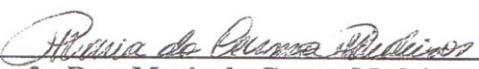
APROVADA EM: 17.08.2007

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Eudice Correia Vilela – CRCN/CNEN-PE



Profa. Dra. Maria do Carmo Medeiros – DN/UFPE



Profa. Dra. Caroline Wanderley Souto Ferreira Anselmo – DEFISIO/UFPE

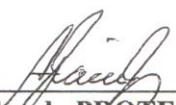


Profa. Dra. Cecilia Maria de Carvalho Xavier Holanda – DMP/UFRN



Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho – DBR/UFPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

A Flávio, Tiago e Pedro, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que é o princípio de tudo.

A meus pais, **Severino e Albertina** pelo amor dedicado durante a minha vida e pelo alicerce fornecido que me possibilitou chegar até aqui.

Ao meu marido **Flávio**, pela extrema paciência, compreensão, amor, constante incentivo e, sobretudo apoio na chegada do nosso segundo filho.

Aos meus filhos, **Tiago e Pedro**, pela compreensão e estímulo, eles são responsáveis, com certeza, pela minha determinação em concluir este trabalho.

Ao **Departamento de Energia Nuclear**, que me acolheu pela segunda vez, pela confiança e pelo fornecimento dos meios necessários a execução deste trabalho. Preciso agradecer a todos, **aos professores** pelo conhecimento transmitido, **aos funcionários** pela constante disponibilidade, **aos alunos** pelo convívio agradável.

Ao **Departamento de Biofísica e Radiobiologia**, minha casa durante esses anos, estou muito grata pelo fornecimento dos meios necessários a execução deste trabalho. Preciso agradecer a todos, **aos professores** pelo respeito e compreensão, **aos funcionários** pela constante disponibilidade, sobretudo a **Grace, Elaine, Valéria e Celida**.

A minha doce e terna **orientadora, Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho**, pela confiança, compreensão, apoio, dedicação, que soube ter pulso forte com amorosidade. Não tenho como externar em palavras tudo que representa na minha vida pessoal e profissional nosso convívio, muito obrigada.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Biofísica Celular e Molecular, em especial a **Edgar, Orion, Jailson, Odinson, André, Tiago, Raquel** e sobretudo àquela que foi minha mão direita e esquerda durante todos os instantes desse trabalho,

Marília. Todos os dias Deus nos presenteia, e você foi um dos grandes presentes que recebi nos últimos anos, és especial, doce, amiga, sempre disponível, compreensiva, e se não bastasse muito competente.

A seu **Fredson**, obrigada pela constante boa vontade nas mais diversas tarefas, obrigada pela companhia agradável, pelo apoio e bom humor.

A minha amiga **Isvânia** pelo incentivo constante na minha vida acadêmica e apoio incondicional em todos os momentos difíceis.

A minha amiga **Andréa Reis**, você foi um presente dos últimos três anos. Ganhei uma senhora parceira para as horas de trabalho e de farra. Obrigada pela sua doce companhia e parceria em todos os momentos.

A **CAPES**, pelo recurso financeiro disponibilizado.

E a todos que contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 As plantas medicinais	4
3.1.1 <i>Momordica charantia</i> L.	5
3.2 Radiação ionizante na medicina	8
3.3 Medicina nuclear e radiofármacos	8
3.4 O tecnécio metaestável (^{99m}Tc)	10
3.4.1 A redução de ^{99m}Tc e a marcação de fármacos	11
3.4.2 O Gerador ^{99}Mo - ^{99m}Tc	13
3.4.3 Controle de qualidade de radiofármacos marcados com ^{99m}Tc	13
3.4.3.1 Ph	14
3.4.3.2 Pureza radionuclídica	14
3.4.3.3 Pureza radioquímica	14
3.5 Interação medicamentosa na medicina nuclear	15
3.6 Compostos radiomodificadores	16
3.6.1 Radiossensibilizadores	17
3.6.2 Radioprotetores	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Aspectos éticos	24
4.2 Animais	24
4.3 Preparação do extrato aquoso	25
4.4 Determinação da toxicidade aguda (DL_{50})	26
4.5 Fracionamento e caracterização do extrato aquoso	27
4.6 Controle radioquímico	27
4.7 Avaliação hormonal e metabólica	27
4. Atividade antiinflamatória	28
4.9 Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas	29
4.10 Fragilidade osmótica e morfologia das hemácias	30
4.11 Biodistribuição	32
4.12 Análise estatística	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Caracterização preliminar	34
5.2 Caracterização metabólica	37

5.3 Propriedades antiinflamatórias	41
5.4 Ação do extrato sobre o tecido hematopoiético	45
5.5 Comportamento biológico	51
5.6 Efeito radioprotetor: considerações	57
6 CONCLUSÕES	59
6.1 Perspectivas	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	Página
DL₅₀ – Dose letal para 50% da amostra estudada	3
^{99m}Tc – Tecnécio-99 metaestável	3
MAP -30 – Proteína recombinante presente na <i>Momordica charantia</i>	5
STZ – Streptozocin	6
USA – Estados Unidos da América	9
⁹⁹Mo – Molibidênio-99	10
keV -Kiloeletrovolt	11
SnCl₂ – Cloreto estanoso	12
NaCl – Cloreto de sódio	12
pH – Potencial hidrogeniônico	14
Rf – Fator de referência	15
μL – Microlitro / 10 ⁻⁶ litro	15
G₀ – Fase do ciclo celular	18
DRF - Fator de redução de dose	19
WR2721 - Aminofostine	22
Hoechst 3342 – composto radioprotetor	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
	6
Figura 1- <i>Momordica charantia</i> – folhas, flor e fruto	13
Figura 2- Gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$	18
Figura 3- Secção transversal de um tumor sólido	28
Figura 4- Procedimento experimental metabólico	30
Figura 5- Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas	31
Figura 6- Procedimento da técnica de fragilidade osmótica	32
Figura 7- Etapas da biodistribuição	35
Figura 8- Perfil do extrato aquoso de <i>Momordica charantia</i> L.	36
Figura 9- Cromatograma do extrato marcado	36
Figura 10- Cromatograma do pertecnetato livre e reduzido	37
Figura 11- Variação da glicose sérica	38
Figura 12- Variação da insulina sérica	40
Figura 13- Variação do cálcio sérico	41
Figura 14- Atividade inflamatória do extrato aquoso da <i>Momordica charantia</i>	43
Figura 15- Curva dose x resposta antiinflamatória	44
Figura 16- Concentração de cortisol sérico	45
Figura 17- Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas	46
Figura 18- Marcação da fração insolúvel de hemácias e proteínas plasmáticas	48
Figura 19- Comportamento do extrato aquoso da <i>Momordica charantia</i> sobre a fragilidade osmótica	49
Figura 20- Efeito do extrato de <i>Momordica charantia</i> L. sobre a morfologia das hemácias	50
Figura 21- Efeito do extrato de <i>Momordica charantia</i> L. sobre a morfologia das hemácias controle e com pertecnetato	

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Biodistribuição da <i>Momordica charantia</i> L. por 2 horas	52
Tabela 2 - Biodistribuição da <i>Momordica charantia</i> L. por 4 horas	53
Tabela 3 - Biodistribuição da <i>Momordica charantia</i> L. estudo crônico, por 10 dias	54

ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAR O EFEITO RADIOPROTETOR DA *MOMORDICA CHARANTIA L.*

Autor: Simey de Souza Leão Pereira Magnata

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

RESUMO

A medicina popular dispõe das plantas como recurso para tratar enfermidades com frequência. Dentre as espécies vegetais utilizadas está a *Momordica charantia L.*, Melão São Caetano, que ocorre nas Américas do Sul e Central e particularmente, no Nordeste do Brasil. Esta espécie tem sido usada como agente anti-diabético, anti-tumoricida, anti-helmíntico e anti-ulcerogênico. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a ação biológica e farmacológica da *Momordica charantia L.*, e seu provável potencial radioprotetor. Neste contexto, ensaios biológicos foram utilizados para caracterizar o extrato aquoso da *Momordica charantia L.* quanto ao efeito tóxico, ao papel metabólico e hormonal, a atividade antiinflamatória, a ação sobre o tecido sanguíneo e sua biodistribuição em camundongos Swiss e ratos Wistar. Os ensaios biológicos fizeram uso de técnicas cromatográficas, bioquímicas, de fragilidade osmótica, de morfologia e de radioimunoensaio. Nos testes realizados havia grupos tratados com o extrato aquoso da *Momordica charantia L.* nas concentrações de 30,60,100 e 250mg/kg e grupos controle negativos e positivos utilizando o AAS 250mg/kg e NaCl 0.9%, respectivamente, a depender do aspecto avaliado. Os resultados obtidos são concordantes com a literatura, contudo destacam-se pela possibilidade de demonstrar propriedades numa espécie do Nordeste brasileiro. Segundo os resultados, o extrato aquoso da *Momordica charantia L.* apresenta comportamento protéico, é passível de marcação com o tecnécio-99m, apresenta evidente propriedade antioxidante comprovada também morfologicamente, não promove fragilidade celular, tem efeito farmacológico acentuado sobre a concentração sérica de insulina e redutor em relação à glicose sérica, altera o cálcio sérico, demonstra atividade antiinflamatória e altera a biodistribuição nos tecidos, sobretudo no fígado, rins e testículos, tecidos que apresentam a enzima antioxidante glutathione, justificando seu provável potencial radioprotetor.

Palavras-chaves: radioprotetor, *Momordica charantia*, radiofarmácia

BIOLOGICAL ASSAYS TO EVALUATE THE RADIOPROTECTOR EFFECT OF *MOMORDICA CHARANTIA L.*

Author: Simey de Souza Leão Pereira Magnata

Adviser: Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

SUMMARY

The folk medicine uses plants and herbs to treat diseases, frequently. The *Momordica charantia*, Melão São Caetano (bitter melon), is found in South and Central America and in Northeast of Brazil. It has been used as an anti-diabetic agent, anti-tumor, anti-helminthic and anti-ulcerogenic. The aim of this study was to evaluate the biological and pharmacological activities of *Momordica charantia*, and its probable radioprotector effect. For this purpose, biological assays were used to study *Momordica charantia*'s aqueous extract, with regard toxic effect, metabolic and hormonal action, to evaluate the anti-inflammatory activity, action on blood tissue and biodistribution in male Swiss mice and male Wistar rats. The biological assays used were: chromatographic, biochemistry, osmotic fragility, morphology and radioimmunoassay techniques. In these experiments, the test groups used *Momordica charantia*'s aqueous extract in some concentrations: 30, 60, 100, 250mg/kg and negative and positive control groups used AAS 250mg/kg and NaCl 0,9%, respectively, to depend on the evaluated aspect. The results agreed with some recent research; furthermore, pointed out properties in a Brazilian Northeast specie. According to results, *Momordica charantia*'s aqueous extract presents protein behavior, is able to labeling red blood cells with tecnécio-99m, has antioxidant properties, also in morphologic aspects, and does not modify cellular fragility. It promotes a significant increase of seric insulin and reduces seric glucose, modifies seric calcium, showed a high anti-inflammatory effect, especially, modifies uptake in the target tissues, over in the liver, kidneys and testis, that presents the antioxidant enzyme glutathione, thus demonstrated its radioprotetor potential.

Key-words: radioprotector, *Momordica charantia*, radiopharmacy

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como recurso terapêutico é aplicado pela medicina popular, desde as primeiras práticas curativas da história. Cerca de 25% dos medicamentos vendidos pela indústria farmacêutica, são derivados das plantas, contudo o mecanismo de ação das mesmas ainda precisa ser melhor elucidado (JAFRI *et al.*, 2000).

Uma tendência atual é estudar as interações recorrentes do uso concomitante desses produtos naturais às intervenções da medicina convencional (BERNARDO-FILHO *et al.*, 1990). E dentre as espécies vegetais utilizadas está a *Momordica charantia L.*, conhecida popularmente como melão São Caetano. Este vegetal pertence à família das Cucurbitaceae e apresenta diversas aplicações dentro da medicina popular e especialmente na medicina Oriental. Esta trepadeira, de finas hastes e folhas alternadas, é encontrada nas Américas Central e do Sul, e particularmente na região Nordeste brasileira. Segundo a população indiana, apresenta propriedade hipoglicemiante, anti-tumoricida e anti-ulcerogênica. É utilizada também como antiinflamatória, de forma empírica, necessitando assim de considerações científicas (PNKNEY & HERRON, 1996; YEY *et al.*, 2003).

Em pesquisa básica, além dos fitoterápicos, outro aliado que tem despertado interesse e apresentado considerável progresso é a radiação ionizante. Ambos são ferramentas úteis na elucidação diagnóstica e terapêutica de doenças, embora não se deva deixar de considerar a interação entre os princípios ativos das plantas medicinais e os radionuclídeos (MATTOS *et al.*, 1999; SIMÕES *et al.*, 1997).

Neste contexto, um diferencial seria estudar as propriedades dos fitoterápicos, correlacionadas às aplicações da radiação ionizante. A literatura demonstra que todos os trabalhos que adotam essa linha de pesquisa, preocupam-se em estudar o aspecto radiomodificador. Essa vertente surge da necessidade de estabelecer meios de proteção às células tratadas pela radiação, já que em radioterapia a dose aplicada é capaz de promover necrose no tecido. Assim, apesar do planejamento realizado antes e durante a execução do

tratamento, a radiação, muitas vezes, danifica também os tecidos sadios (JAGETIA & BALIGA, 2002; JAGETIA *et. al.*, 2004).

Dessa forma, em todas as pesquisas que visam determinar características radiomodificadoras, a busca é crescente em relação ao aspecto radioprotetor. Nesses estudos, o alvo é a concentração sérica da enzima glutatona, pois a mesma exerce papel antioxidante no sistema biológico. Neste trabalho foi realizada uma abordagem mais ampla, onde houve uma caracterização metabólica, hormonal e farmacológica, do extrato aquoso da *Momordica charantia L.* e além disso foi possível realizar considerações em relação ao seu provável efeito radioprotetor a partir dos dados obtidos, fazendo correlações fisiológicas. Diante do exposto, a busca de plantas medicinais com propriedades radioprotetoras deve ser estimulada. Esses estudos podem proporcionar a fusão de ferramentas disponíveis no país e estimular à biotecnologia, sobretudo com a possibilidade de diminuir a interface entre as ciências básicas e garantir respaldo social.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação biológica e farmacológica da *Momordica charantia L.*, a partir do seu extrato aquoso. Em particular observar seu provável potencial radioprotetor, utilizando técnicas convencionais e da radiofarmácia.

2.2 Objetivos específicos

Determinar o efeito do extrato aquoso da *Momordica charantia L.* em ratos Wistar e camundongos Swiss, a depender do experimento, sobre os seguintes aspectos:

- Efeito tóxico em animais (DL₅₀);
- Caracterização bioquímica e radioquímica, em relação ao ^{99m}Tc;
- Efeito metabólico (glicose e cálcio) e hormonal (insulina e cortisol);
- Ação antiinflamatória;
- Ação sobre a marcação de hemácias e proteínas do plasma com ^{99m}Tc e a fragilidade osmótica.
- Avaliar a morfologia das células sangüíneas;
- Avaliar a biodistribuição no animal estudado, de forma aguda e crônica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 As plantas medicinais

Os primeiros recursos que o homem dispôs para tratar de suas enfermidades foram provenientes de plantas e ervas, tendência essa que se perpetua uma vez que é incalculável o número de princípios ativos que estão ao alcance e ainda são desconhecidos. Dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas do mundo foram estudadas quanto ao seu potencial de ação, número que cai para 8% no Brasil. Com base nessas informações, observa-se um déficit alto, quanto aos estudos dos fitoterápicos, já que o Brasil apresenta a maior diversidade genética vegetal do mundo (BROWN, 1995; SOEJARTO, 1996).

As plantas medicinais apresentam uma ou mais substâncias químicas com ação farmacológica capazes de interagir com o organismo humano e de outros animais, restabelecendo sua saúde e equilíbrio. Estima-se que 2/3 da diversidade biológica mundial estão nas zonas tropicais, das quais, os recursos genéticos constituem as espécies de interesse sócio-econômico atual e um patrimônio nacional (EMBRAPA, 2004).

Os fitoterápicos são substâncias ativas presentes nas plantas medicinais como um todo, ou em parte dela, podendo ser extraídos através de diversos procedimentos. Em sua grande maioria, os constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica não são conhecidos e envolvem a interação de várias moléculas presentes no extrato ou em outros componentes do vegetal (EMBRAPA, 2004).

Os fármacos naturais, ou seja derivados de plantas medicinais, foram durante muito tempo, o principal e único recurso disponível aos profissionais da saúde. A exemplo disso, tem o uso da tamarindo (*Tamarindus indica*), cujo fruto é excelente para tratamento de lesões no estômago e esôfago; o coco (*Cocos nucifera*), cuja preparação pode ser usada para o tratamento de doenças do estômago; a quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) usada para distúrbios renais e a mirra (*Commiphora molmol*) conhecida como tônico, expectorante e estimulante das funções digestivas. Além desses, também se destacam o maracujá-açu (*Passiflora quadrangularis*), que é bastante usado como sedativo, e a *Punica*

granatum (romãzeiro), que é um arbusto denso e ramoso, de coloração verde brilhante, usado na medicina popular como antiviral, antidisentérico, anti-inflamatório e bactericida (NIMRI; MEQDAM & ALKOFABI, 1999; MOUHAJIR *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2000), demonstrando também atividade sobre os níveis de glicose em ratos (JAFRI *et al.*, 2000).

3.1.1 *Momordica charantia* L.

Há alguns exemplares de vegetais que se destacam pelo potencial terapêutico aplicável a diversos distúrbios fisiopatológicos. Uma delas, conhecida popularmente no Brasil, como “Melão de São Caetano” tem sido usada como antidiabético, anti-helmintico, contraceptivo, purgativo, sendo útil também no tratamento do reumatismo, de febres e estomatites (GROVER & YADAV, 2004).

A *Momordica charantia* L., Figura 1, pertence à família das Cucurbitaceae, é uma trepadeira tropical de hastes finas e frágeis que ocorre no México, Caribe, nas Américas Central e do Sul e no Extremo Oriente. As folhas são flácidas, verdes opacas e alternadas, os frutos são oblongos e de coloração laranja brilhante, quando maduros. É tradicionalmente usada na medicina Oriental e Caribenha, é rica em vitaminas A e C; os frutos verdes e as sementes contêm mais princípio ativo do que as folhas, e seu extrato tem ação abortífera. A decocção das folhas é usada no tratamento de muitas doenças como estomatite, febre, diabetes, câncer, entre outras, sendo enfatizada a sua ação hipoglicemiante em pesquisas (PINKNEY & HERRON, 1996).

A *Momordica charantia* L. apresenta propriedades anti-HIV e antitumoral, graças à atividade da proteína MAP30 e MAP30 recombinante, presentes na mesma, conforme LEE-HUANG *et al.* (1995), como também devido a MRK 29, descrita por JIRATCHARIYAKUL *et al.* (2001) e a alfa-mormocharin, segundo ZENG *et al.* (1999). Ao agir como antitumoral, a MAP 30 atua em células humanas de câncer de mama conforme LEE-HUANG *et al.*, (1994) e nas experimentações com o câncer de cólon (KOHNO *et al.*, 2004). O seu extrato é usado com sucesso também nos casos de leucemias em ratos (CUNNICK *et al.*, 1990). O suco do fruto quando administrado em pacientes com câncer de colo uterino, que foram submetidos à radioterapia, não altera os níveis de células do

tipo linfócitos naturais killer, mas modifica a concentração de P-glicoproteína nas membranas das células alteradas (PONGNIKORN *et. al.*, 2003).



Figura 1: *Momordica charantia* – folhas, flor e fruto (www.chiquita.com/naturecommunity/images).

Seus efeitos sobre o diabetes são explorados sob diferentes abordagens. O extrato alcoólico e aquoso da *Momordica charantia* promove segundo RATHI, GROVER & VATS (2002) queda drástica na concentração sérica de glicose em ratos aloxanizados e camundongos tratados com streptozocin (STZ). AHMED *et al.* (2001) relatam a capacidade do suco em reduzir também os níveis de lipídeos e aumentar o colesterol não esterificado, triglicerídeos e fosfolipídeos no plasma de ratos com diabetes tipo I. Uma pesquisa, realizada em 100 pacientes com diabetes melitus tipo II moderada, que ingeriram uma suspensão aquosa da polpa do melão, demonstra ação hipoglicemiante em 86% dos casos (AHMAD *et al.*, 1999). O Diamed, uma formulação composta por três plantas medicinais (*Azardirachta indica*, *Cassia auriculata* e *Momordica charantia*) provoca uma redução na glicose sangüínea, na hemoglobina glicosilada e um aumento na insulina plasmática e hemoglobina total (PARI, RAMAKRISHNAN & VENKATESWARAN, 2001).

Uma avaliação a partir do fruto da planta, demonstra um aumento significativo do número de células β pancreáticas, assim como das células δ (AHMED *et al.*, 1998; AHMAD *et al.*, 1999). Se os testes são realizados em camundongos diabéticos induzidos por streptozocin (STZ), observa-se o efeito hipoglicemiante do suco do melão de São Caetano tanto *in vivo* quanto *in vitro*, havendo também um efeito radioprotetor das células supracitadas e das células β (SITASAWAD, SHEWADE & BHONDE, 2000).

Os diferentes aspectos da *Momordica charantia* são tratados em trabalhos, incluindo diversas plantas da Índia, que apresentam potencial antidiabético (GROVER; YADAV & VATS, 2002; KAR, CHOUDHARY & BANDYOPADHYAY, 2003; YEH *et al.*, 2003) e com atividades antioxidantes (SCARTEZZINI & SPERONI, 2000). Os efeitos adversos e a eficácia clínica são abordados numa revisão, segundo BASH; GABARDI & ULBRICHT (2003) e nesta admite-se que componentes do extrato do melão de São Caetano tenham similaridades estruturais com a insulina animal.

As frações metanólicas de Koimidori, uma variedade da *Momordica charantia* L, parece ter potente atividade redutora do triglicerídeo hepático (SENANAYAKE *et al.*, 2004). O extrato da planta é capaz de modular a expressão de glutathione S-transferase de ratos diabéticos e reverter sua distribuição tecidual aos níveis controle (RAZA, AHMED & JOHN, 2004).

Indicativos experimentais denotam potencial antiinflamatório da *Momordica charantia* L.. Uma peroxidase presente na planta, obtida de frações cromatográficas, catalisa a oxidação do ácido ferúlico a um agente inibidor da liberação de fatores proinflamatórios, de acordo com OU *et al.* (2003). Ao ser administrado na dieta, induz respostas antiinflamatórias *in vivo*, de forma sistêmica, e *in vitro*, em células do epitélio intestinal (MANABE *et al.*, 2003).

Apesar das propriedades presentes na *Momordica charantia* L, segundo a literatura, ainda existe a necessidade de investigar e esclarecer o seu mecanismo de ação adequado. É importante avaliar a ação fisiológica que o vegetal apresenta, sobretudo, aquela espécie encontrada no Nordeste brasileiro, para o desenvolvimento científico local e interrupção do uso empírico. Outro aspecto que deve ser ressaltado, é que as propriedades de uma planta estão relacionadas

com o solo e condições ambientais aonde é cultivada, proporcionando assim propriedades específicas para cada região estudada.

3.2 Radiação ionizante na medicina

Além das plantas medicinais, outra ferramenta com papel fundamental nas práticas curativas é a radiação ionizante. Suas aplicações têm crescido ao longo dos anos e demonstrado ser de grande importância na elaboração e aprimoramento de tratamentos e principalmente, diagnósticos. Essa contribuição teve início com a descoberta dos raios-X por Röntgen em 1895 e da radioatividade natural por Becquerel, em 1896 (EARLY & LANDA, 1995; ICE, 1995).

Segundo CAMERON & SKOFRONICK (1978), as primeiras observações sobre danos biológicos gerados pelo uso da radiação ionizante, sugeridas desde 1896, envolvem operadores de raios-X que sofreram queimaduras. Logo depois, o casal Curie mostra a possibilidade de utilizar as radiações ionizantes para destruir células cancerosas, através da radiação emitida pelo elemento Rádio, esse procedimento foi denominado de “Curieterapia”(BRODSKY, KATHEN & WILLIS, 1995). Em seguida, instituiu-se a radioterapia, um tratamento usando a radiação ionizante, que consiste em aplicação programada de doses de radiação ionizante para destruir as células tumorais (CAMERON & SKOFRONICK, 1978).

No início do século XX, segundo CAMERON & SKOFRONICK, (1978) começaram os procedimentos em medicina nuclear, quando Wickman e Degrais, em 1910, utilizam-se de injeções de rádio em lesões cutâneas provocadas pelo lúpus e em 1913, Frederick Proescher publica sobre a injeção intravenosa de rádio para tratamento de outras doenças. Dessa forma, o uso racional da radiação ionizante cresceu progressivamente até os dias atuais.

3.3 Medicina nuclear e radiofármacos

A medicina nuclear é a especialidade médica voltada ao uso diagnóstico ou terapêutico de compostos radioativos, os chamados radiofármacos. A riqueza e a capacidade diagnóstica em medicina nuclear residem na diversidade dos

radiofármacos disponíveis atualmente. O termo legalmente definido para radiofármaco pela Federal Register of USA é fármaco radioativo, ou seja, uma substância a qual apresente propriedades farmacológicas e que esteja acoplada a um radionuclídeo capaz de apresentar desintegração espontânea de núcleo instável, com emissão de partículas nucleares ou fótons (RODHES & CROFT, 1978).

A radiofarmácia é definida pelo Conselho Federal de Farmácia, em sua resolução 456, como a prática farmacêutica no estudo, preparação, controle e dispensação dos medicamentos do tipo radiofármacos, conceito esse válido para a área industrial e hospitalar. A radiofarmácia é o ramo da ciência que estuda os aspectos da química, farmacologia, bioquímica, fisiologia e disciplinas similares, visando o uso de substâncias radioativas como traçadores metabólicos (BRASIL - CFF, 2005).

Conforme RODHES & CROFT (1978) foram às atividades realizadas no Instituto Oak Ridge, em 1946, que iniciaram o uso e produção dos radionuclídeos para aplicações médicas. Como a radiofarmácia depende da presença de um radiofármaco adequado, é importante entender as aplicações desses compostos. A nível estrutural, um radiofármaco apresenta um radionuclídeo, que é fonte de radiação, e um fármaco, responsável pela seletividade biológica do composto.

Em torno de 95% dos radiofármacos usados em medicina nuclear são para fins diagnósticos e possuem especificidade com o órgão (alvo) a ser estudado. Este complexo, normalmente, é administrado em pequenas quantidades, devendo apresentar caráter apirogênico e esterilidade, como também, ser submetido a um controle de qualidade que assegure o seu emprego (EARLY & SODEE, 1995; HARBERT;ECKELMAN & NEWMAN, 1996).

Para fins diagnósticos, o radiofármaco, além de apresentar seletividade por um órgão, deve retratar a fisiologia e a fisiopatologia do sistema em estudo, deve ter uma meia-vida curta e uma atividade que permita sua detecção no organismo. Nesse caso, mantém-se a radiação no nível mais baixo possível, dando-se preferência a radionuclídeos que não emitam nem radiação beta nem alfa (HARBERT;ECKELMAN & NEWMAN, 1996).

Os radiofármacos são administrados em humanos e como existem limitações quanto à detecção externa das radiações, no âmbito do diagnóstico,

eles devem apresentar algumas características importantes. Essas propriedades são necessárias do ponto de vista físico, químico e biológico, dentre as quais se destacam: ser de fácil obtenção; emitir radiação de natureza e energia adequada à finalidade; ter meia-vida efetiva curta; possuir alta razão tecido alvo/tecido não alvo; apresentar estabilidade *in vivo*; ter solubilidade, e ser passível de reações de marcação, ou seja, atender a todas as exigências de um fármaco de uso parenteral (SAHA, 1998).

A aplicação dos radiofármacos, como fontes não seladas, também tem finalidades terapêuticas. Na terapia, o radiofármaco serve como “fonte de irradiação”. Ele também pode ser empregado para irradiar uma determinada região, no tratamento de tumores. Ele pode ser administrado localmente, diretamente no sítio a ser irradiado, ou de forma sistêmica, por via oral ou endovenosa. O critério de seleção do radionuclídeo, para uso terapêutico, baseia-se em sua meia-vida efetiva e no tipo de emissão (RODHES & CROFT, 1978).

3.4 O tecnécio metaestável (^{99m}Tc)

Mesmo com o advento tecnológico e desenvolvimento de outros radionuclídeos, o ^{99m}Tc é um dos radionuclídeos (RN) mais utilizados na prática médica. Este RN foi descoberto pelo físico italiano E. Segré, em 1936, ao realizar seus estudos no instituto Berkeley (EUA), num dos primeiros ciclotrons do mundo. Observou-se que um radionuclídeo, denominado molibidênio-99 (^{99}Mo), quando irradiado com dêuterons originava um outro elemento, desconhecido naquela data, que era capaz de emitir radiação. Ao analisar melhor o fenômeno, Segré, juntamente com o seu auxiliar C. Perrier publicaram suas conclusões em 1937, porém o nome proposto para o novo elemento só foi aceito oficialmente em 1946. O termo tecnécio, em grego significa “o artificial”; atualmente são conhecidos 21 isótopos do tecnécio, todos radioativos, com número de massa que varia de 90 a 110 e com meia vida de 0,83 segundos a $4,2 \times 10^6$ anos (HUSAK & VLCEK, 1982; HOLLAND; DEUTSCH & HEINEMAN, 1986; BONNYMAN, 1983).

O tecnécio (Tc) é um dos elementos mais utilizados, na medicina nuclear, porque apresenta características altamente favoráveis ao seu uso. Ele é um produto do decaimento radioativo do ^{99}Mo por emissão beta negativa. É

encontrado num estado metaestável, onde sua desativação ocorre por transição isomérica a ^{99}Tc , com emissão de fóton gama principal de energia da ordem de 140 keV. Como os fótons nesta faixa de energia apresentam boa penetração nos tecidos, sua meia vida é curta (6 horas) e a sua radiotoxicidade é baixa. O emprego deste radionuclídeo na medicina nuclear é interessante, pois estas características citadas, resultam em altas taxas de contagens e numa melhor qualidade das imagens (BAUER & PABST, 1982; HUSAK & VLCEK, 1982; HOLLAND; DEUTSCH & HEINEMAN, 1986; BONNYMAN, 1983).

Aproximadamente 80% de todos os radiofármacos usados na medicina nuclear são compostos marcados com tecnécio metaestável (^{99m}Tc). A razão dessa preferência são as características físico-químicas extremamente favoráveis, já citadas neste texto, que esse radionuclídeo apresenta, ressaltando a facilidade de conjugação com outras moléculas, devido o mesmo apresentar oito estados de oxidação, de -1 a +7, como resultado da perda de elétrons nos orbitais 4d e 5s ou do seu ganho no orbital 4d, além da viabilidade de obtenção pelo gerador ^{99}Mo - ^{99m}Tc (ARANO, 2002).

O ^{99m}Tc é um isótopo considerado ideal para as aplicações médicas. Sua meia-vida é longa o suficiente para permitir a realização dos exames diagnósticos a que se propõe, mas curta o suficiente para que as doses que o paciente receba sejam mínimas. A ausência de emissão beta diminui ainda mais as doses recebidas pelo paciente, por isso o ^{99m}Tc pode ser empregado em atividades mais altas com redução do tempo de rastreamento no exame (BAUER & PABST, 1982; SAHA, 1998).

3.4.1 A redução de ^{99m}Tc e a marcação de fármacos

O ^{99m}Tc é obtido a partir do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ na forma de pertecnetato de sódio, cujo ânion $[(\text{Tc}^{7+}\text{O}_4^{2-})]$ apresenta-se num estado de oxidação não reativo. Isso torna necessária uma reação de redução, para que, num estado de oxidação mais baixo, haja ligação química. A redução e a formação dos complexos marcados com o radionuclídeo ^{99m}Tc dependem do potencial redox, da concentração dos agentes redutores, da estabilidade do complexo, da temperatura e do tempo decorrido após o contato com os reagentes (RODHES &

CROFT 1978). Os radiofármacos para marcação são encontrados na forma de kits comerciais que contém o fármaco liofilizado, um agente redutor e também podem conter um agente conservante (HOLLAND; DEUTSCH & HEINEMAN, 1986; SAHA, 1998).

O agente redutor mais amplamente empregado é o cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Normalmente este agente redutor compõe os kits na forma liofilizada junto ao fármaco a ser marcado. As espécies reduzidas de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ podem combinar-se com vários quelantes, os quais doam um único par de elétrons para formar ligação coordenada covalente. Alguns grupos oxi e oxitecnécio são responsáveis pela estabilização dos complexos- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A estereoquímica dos compostos depende do ligante, número, tipo e arranjo dos átomos doadores, conformação do ligante e geometria de coordenação do metal, dentre outros fatores (IKEDA; INOUE & KURATA, 1976; SAHA, 1998).

Elementos do sangue marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ têm sido usados em clínicas de medicina nuclear em muitas aplicações: imagem do sistema cardiovascular, detecção de hemorragia no sistema gastrointestinal e localização de hemangiomas intramusculares (EARLY e SODEE, 1995).

Em se tratando da marcação de estruturas biológicas, um tecido muito estudado é o hematopóietico, já que é o primeiro a apresentar alterações em caso de contaminação e/ou acidentes e servir como fonte diagnóstica. Na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas, a presença de substâncias químicas de origem natural ou sintética, pode alterar a qualidade da marcação. No procedimento experimental da marcação de hemácias com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o cloreto estanoso e o pertecnetato são utilizados porque atravessam bem a membrana plasmática e assim, quanto mais reduzido estiver o complexo, maior será a eficiência da marcação e maior também a captação do radionuclídeo nas hemácias (OLIVEIRA *et. al.*, 2000). Além disso, o mecanismo de fixação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nas hemácias consiste na ligação do radionuclídeo na hemoglobina, mais precisamente em sua cadeia β (SAHA, 1998; BERNARDO-FILHO *et. al.*, 2005).

3.4.2 O Gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Segundo HOLLAND; DEUTSCH & HEINEMAN (1986), o gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi desenvolvido pelo Brookhaven National Laboratory. Ele utiliza o molibdênio-99 (^{99}Mo), meia-vida de 67h, como átomo primitivo (pai) gerando, por emissão beta, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, átomo derivado (filho), com meia-vida de 6h. Fisicamente o gerador constitui-se num cilindro, blindado por chumbo, que acondiciona na estrutura interna o molibdênio, de maneira a permitir a extração do $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Uma boa parte dos geradores de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utiliza um sistema no qual o ^{99}Mo , sob a forma de molibdato, encontra-se fortemente adsorvido numa coluna de alumina, (Figura 2). A eluição é feita com solução salina (NaCl) 0,9%, onde o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é arrastado, dissolvido na forma de pertecnetato (TUBIS & WOLF, 1976; HUSAK & VLCEK, 1982).

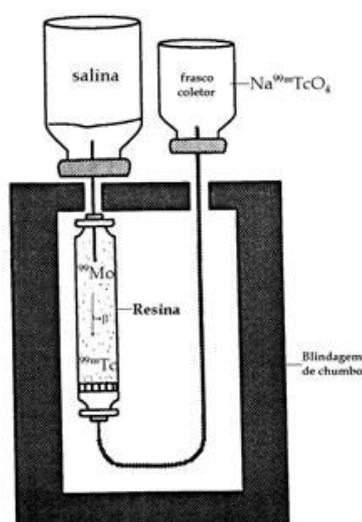


Figura 2: Gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (TUBIS & WOLF, 1976)

3.4.3 Controle de qualidade de radiofármacos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Os testes de controle de qualidade são importantes para os fármacos em geral e podem ser de duas categorias: os físicos-químicos e os biológicos. Os primeiros incluem ensaios de pureza química, osmolaridade, pH, condutividade e estado físico, principalmente em se tratando de um colóide. Os outros testes

abrangem ensaios de esterilidade, apirogenicidade e toxicidade. Os ensaios mais comuns nas radiofarmácias hospitalares são as determinações de pH, pureza radionuclídica e radioquímica (SAHA, 1998).

3.4.3.1 pH

Os valores do pH vão interferir na adequação fisiológica e estabilidade radioquímica do fármaco. A maioria dos radiofármacos está numa faixa de pH entre 4 e 8,5, no entanto níveis de pH mais extremos são admitidos devido ao poder tamponante do sangue (BAUER & PABST, 1972).

3.4.3.2 Pureza radionuclídica

A pureza radionuclídica é a razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo, em relação à radioatividade total da fonte. Para estabelecer essa pureza, a radioatividade e a identidade de cada nuclídeo presente devem ser conhecidas. Muitas substâncias radioativas para uso médico contêm pequenas quantidades de radionuclídeos não intencionais. Existem diferentes razões para isso, a contaminação pode ocorrer durante o processo de produção ou, no caso do sistema de geradores, na separação incompleta do radionuclídeo filho em relação ao radionuclídeo pai. Normalmente essas impurezas não aumentam a dose absorvida, ainda assim, a presença de nuclídeos estranhos pode aumentar a dose de radiação ao paciente e obscurecer a imagem cintilográfica (BAUER & PABST, 1982).

3.4.3.3 Pureza radioquímica

A pureza radioquímica é a razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo testado, em relação ao total da radioatividade do radionuclídeo presente na fonte. Sua determinação consiste em separar substâncias químicas diferentes que contêm o radionuclídeo e a medida de radioatividade ligada à substância química declarada. Dentre os métodos de separação analítica, aquele mais indicado, é a cromatografia em placa, graças a

sua simplicidade e confiabilidade. Este teste é importante, pois a presença de impurezas radioquímicas resulta na perda de qualidade da imagem devido ao alto *background* dos tecidos vizinhos e do sangue (BAUER & PABST, 1982).

Na cromatografia, uma alíquota do radiofármaco, de 10uL em média, é aplicada na fase estacionária, geralmente numa tira, ou de papel Whatman, ou placa impregnada com sílica gel (conhecida como ITLC-SG do inglês *instant thin-layer chromatography sílica gel*). Então a corrida cromatográfica decorre de forma ascendente num recipiente fechado com sistema de eluição apropriado (SAHA, 1998).

Após o desenvolvimento da cromatografia, com a fase estacionária seca, as posições das áreas radioativas são detectadas por um dos três métodos: autoradiografia, medida da radioatividade ao longo da placa com auxílio de contadores ou pelo corte da tira em faixas e medida da radioatividade em cada uma delas. Logo em seguida, cada componente é caracterizado pelo valor do fator relacional (Rf), o qual é definido como a razão entre a distância percorrida pelo componente e a distância percorrida pelo sistema de eluição desde o ponto de aplicação (SAHA, 1998).

3.5 Interação medicamentosa na medicina nuclear

O diagnóstico de doenças cada vez mais, com o passar dos anos, tem sido favorecido pela análise de imagens. Estas, atualmente, podem ser obtidas através do uso de variados agentes físicos, como as ondas mecânicas, o ultra-som, a ressonância nuclear magnética, os raios-X e a radiação gama. As imagens obtidas contribuem com os profissionais de saúde na elucidação de tratamentos medicamentosos e/ou reabilitação (EARLY & SODEE, 1995; HARBERT; ECKELMAN & NEWMAN, 1996).

Na medicina nuclear, os exames cintilográficos são os mais utilizados para um diagnóstico adequado. Como a imagem obtida depende da biodisponibilidade do radiofármaco e está intimamente associada ao metabolismo de cada órgão alvo, essa imagem é considerada metabólica. Assim, alterações no metabolismo já podem ser observadas, antes mesmo que modificações anatômicas ocorram, contribuindo para uma identificação precoce de afecções orgânicas. Nesse

contexto, aspectos teóricos e práticos da interação de drogas terapêuticas com radiofármacos devem e têm sido estudados, gerando informações conflitantes com a literatura especializada (BERNARDO-FILHO *et al.*, 1990).

Assim, o conhecimento da possibilidade da interação medicamentosa, sobretudo de fitoterápicos, com radiofármacos é fundamental, uma vez que, pode acarretar diagnóstico e tratamentos equivocados. Não se pode esquecer também que, se houver repetição do exame, vai ocorrer um aumento na exposição a radiação ionizante ao paciente e aos profissionais envolvidos no serviço. Este fato proporcionou uma atenção cuidadosa ao se tratar de diagnósticos com uso de radiofármacos, para que os resultados obtidos não sejam inadequados e não promovam uma má interpretação dos exames. Isto porque, o comportamento do radiofármaco pode não ser o esperado e assim tanto esta biodisponibilidade, quanto à ligação do radiofármaco às hemácias e/ou leucócitos pode ser comprometida pela presença de princípios químicos originados de medicamentos naturais, justificando um estudo mais elaborado desta possibilidade (SAHA, 1998; MORENO *et al.*, 2004).

3.6 Compostos radiomodificadores

As substâncias sintéticas e/ou naturais quando são administradas no organismo podem influenciar na interação da radiação com a matéria, modificando seus efeitos biológicos. A radiação é uma forma de energia capaz de se propagar em meios materiais. Ao atingir o organismo vivo pode ejetar elétrons orbitais de átomos presentes na matéria orgânica, tais como o hidrogênio, oxigênio, carbono e o nitrogênio. Dessa forma, no contexto biológico, podem provocar efeitos danosos como eritemas, diminuição da resposta imunológica e evolução dos danos até o câncer, aspecto esse de interesse para o estudo da proteção radiológica (HALL, 1994).

3.6.1 Radiossensibilizadores

A interação da radiação com a matéria pode proporcionar modificações de caráter radiosensibilizador ou radioprotetor, vai depender das características químicas da substância e, conseqüentemente, de sua forma de interação com o organismo (JAGETIA *et. al.*, 2003). As substâncias com propriedades radiosensibilizadoras são quimicamente ou farmacologicamente facilitadoras para os efeitos da radiação. Sua ação em células de mamíferos tem sido observada na prática da radioterapia, atuando de maneira semelhante nas células tumorais e nos tecidos não sadios (HALL, 1994).

Na radioterapia clínica o efeito radiosensibilizador é utilizado sob dois aspectos, o uso das pirimidinas halogenadas ou a diminuição de hipóxia celular. As pirimidinas¹ halogenadas agem reduzindo a necessidade de incorporação de análogos químicos e se baseia no fato do ciclo celular nas células tumorais ocorrer em tempo inferior, em relação ao tempo do ciclo no tecido normal e assim incorporar um quantitativo maior de droga. Devido à similaridade desses compostos com a base timina, eles podem ser incorporados à cadeia do ácido desoxirribonucléico (DNA). Esta substituição permite que as células se tornem mais sensíveis aos danos promovidos pela radiação X e ultravioleta, contudo o efeito radiosensibilizador só ocorre efetivamente se a substituição ocorrer durante várias gerações celulares (HALL, 1994; JAGETIA *et. al.*, 2003).

Em se tratando da inibição de hipóxia celular, esta situação ocasiona um retardo no crescimento tumoral. É importante lembrar que a estrutura de um tumor não consiste, simplesmente, em um aglomerado de células, (Figura 3). As células neoplásicas ocupam menos da metade do volume tumoral, existem vasos sanguíneos e colágeno. Algumas áreas são bem irrigadas, outras têm pouca ou nenhuma vascularização (células anóxicas e necróticas) e àquelas existentes entre estas duas regiões está em hipóxia, ou seja baixa concentração de oxigênio (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

¹ Pirimidinas – base nitrogenada semelhante à timina presente no ácido desoxirribonucléico (DNA) com substituição do grupamento metila pelo grupamento halogenado.

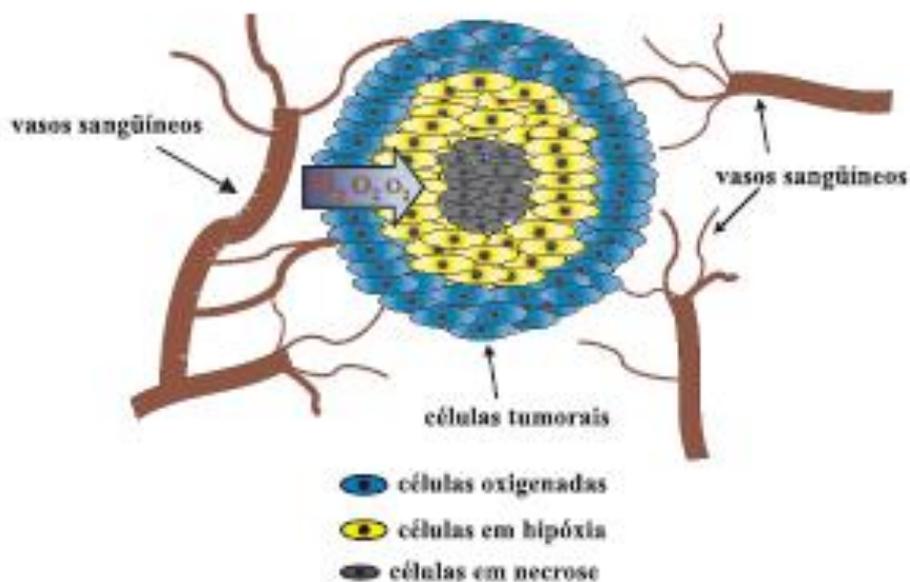


Figura 3- Secção transversal de um tumor sólido (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

A radiosensibilidade celular sofre influência do aporte de oxigênio presente. As células com oxigenação ideal são mais sensíveis aos efeitos da radiação ionizante do que àquelas em hipóxia ou seja com baixa concentração de oxigênio. Isto ocorre devido à rápida ligação das moléculas de oxigênio com os radicais livres, os quais são moléculas reativas, aumenta o potencial destrutivo destes as biomoléculas. As células em hipóxia são resistentes à radioterapia graças à baixa concentração de oxigênio e provavelmente resistentes a quimioterapia também, pois permanecem em estado G_0 do ciclo celular por tempo indeterminado. Uma aplicação prática desta possibilidade é a câmara hiperbárica, onde a radiosensibilidade celular é estimulada nestas áreas com alta concentração de oxigênio (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

Outro aspecto que deve ser ressaltado é que a eficiência da radiosensibilidade é dependente da eletroafinidade dos compostos, favorecendo melhores resultados em estudos *in vitro* do que *in vivo*, onde as condições químicas e farmacológicas são mais dificilmente controladas (ZEMAN *et. al.*, 1988; ADAMS, 1992).

Dentre os compostos radiosensibilizadores conhecidos, existe o misonidazole que é clinicamente usado como bloqueador da tricomoníase e do crescimento tumoral. Este agente pertence ao grupo dos nitro-heterocíclicos, especialmente da classe dos nitroimidazóis, que segundo FARREL (1989) junto com os carboxilatos de ródio (II) apresentam boa atividade radiosensibilizadora, mimetizando os efeitos danosos do oxigênio. O misonidazole apresentou resultados eficientes em animais e parece ativo também em humanos. No entanto é neurotóxico, dessa forma novas investigações têm sido feitas com alterações em sua estrutura química para atingir uma toxicidade dez vezes menor, considerado valor ideal (OLIVEIRA & ALVES, 2002). Outro agente da mesma classe química seria o etanidazole que apresenta propriedades semelhantes, porém, uma meia vida inferior e constituição mais hidrofílica, quando comparado ao misonidazole e propriedades semelhantes (URTASUN *et. al.*, 1986).

3.6.2 Radioprotetores

Compostos químicos ou naturais também podem atuar como radioprotetores. A primeira evidência surgiu ao se estudar a cisteína², em 1948, quando Patt observou que os camundongos eram protegidos dos efeitos de uma irradiação de corpo inteiro. Desde então, compostos com variadas propriedades farmacológicas e químicas têm sido estudados sob este aspecto. Nestes estudos foi observado que os compostos sulfidrílicos, presentes na cisteína, apresentam intensamente a característica radioprotetora (HALL, 1994).

A avaliação do efeito radioprotetor é normalmente feita a partir de um indicador, fator de redução de dose (Dose Reduction Factor – DRF), (Equação 1), segundo JAGETIA; VENKATESH & BALIGA (2004) definido como :

$$\text{DRF} = \frac{\text{Dose na presença da droga}}{\text{Dose na ausência da droga}} \quad (1)$$

² Cisteína – aminoácido natural que contém um grupamento sulfidrílica.

Apesar do estudo de vários compostos sintéticos quanto à atividade radioprotetora, não houve uma substância que preenchesse todas as características necessárias à recomendação de seu uso na clínica, sugerindo assim a necessidade de investigar a ação radiomodificadora de produtos naturais bioativos (JAGETIA & BALIGA, 2002).

O mecanismo de ação dos radioprotetores pode ocorrer através do bloqueio na formação dos radicais livres, que são compostos de alta reatividade e gerador de danos celulares. Os radioprotetores competem com o oxigênio e quando o substituem na reação, formam estruturas não danosas às células. A ação radioprotetora age em paralelo com o efeito oxigênio, apresentando conseqüências máximas para radiações do tipo X e gama, contudo apresenta efeito mínimo para as partículas alfa de baixa energia (JAGETIA; VENKATESH & BALIGA, 2004).

No mesmo grupo químico da cisteína estão os aminotióis, potentes radioprotetores teciduais. Seu mecanismo de ação pode ser via produção da hipóxia celular, bloqueando os radicais livres, inibindo a reparação do ácido desoxirribonucléico (DNA), aumentando a captação de cisteína ou estimulando a biossíntese de glutathiona (GSH), que é um radioprotetor natural de natureza enzimática. Entretanto, os aminotióis apresentam um papel mutagênico e carcinogênico e podem contribuir para recidivas tumorais. Dessa forma os compostos dessa classe têm sido sintetizados e investigados, como o aminothioliol 2-N-propylamine-cyclo-hexanethiol (20-PRA), buscando manter sua ação radioprotetora e minimizar sua toxicidade (DOLABELA *et. al.*, 1998).

Outro aspecto que merece destaque é a presença de glutathiona (GSH) e da superóxido desmutase (SOD), enzimas associadas a redução da peroxidação lipídica. JAGETIA *et. al.* (2004) observaram que quando ocorre à redução na peroxidação lipídica, acontece também o aumento na concentração de GSH, favorecendo a proteção da célula. O uso da radiação ionizante induz a peroxidação lipídica e esta danifica o DNA promovendo a morte celular. Os radicais livres formados iniciam a peroxidação lipídica, principalmente dentro da membrana celular com alta concentração de ácidos graxo poli-insaturados. Como as membranas microssomais e mitocôndrias apresentam grande quantidade de

ácidos graxos, são as mais susceptíveis a peroxidação lipídica que leva à perda da integridade e funcionalidade celular.

Nesta perspectiva, plantas como a *O. Sanctum*, *Moringa oleifera*, *Mentha arvensis* e *Syzygium cumini* têm sido estudadas e citadas como radioprotetoras na mortalidade de camundongos (JAGETIA & BALIGA, 2002; UMA DEVI & GANASOUNDARI, 1995; JAGETIA *et. al.*, 2003). Assim como a *Spirulina platensis*, *Alium sativum*, *O. Sanctum*, *Chlorella vulgaris*, *Phyllanthus niruri*, *Panax ginseng* e *Ginkgo biloba*, que reduzem os danos radioinduzidos no tecido de camundongos (ALAOUI-YOUSSEFI *et. al.*, 1999).

Outro fitoterápico estudado é o marmelo-da-índia, *Aegle marmelos* (L.) *Correa*, popularmente conhecido como “bael”, muito utilizado pela população indiana, onde é aproveitada praticamente toda a planta, e possui uma conotação mística, sendo conhecida como a árvore do *Lord Shiva*. Na medicina indígena, a planta é utilizada no tratamento de diarreias e distúrbios estomacais, o fruto apresenta ação antioxidante e as folhas atividade regenerativa nas células β pancreáticas de ratos. A planta conhecida como “bael” também age semelhantemente à insulina orgânica, pois contribui para a redução da glicose sérica e controle da massa corporal. Apresenta efeito citotóxico em células neoplásicas de humanos, de diferentes origens histológicas, em estudos *in vitro* (SHOBA & THOMAS 2001; KMALAKKANNAN & STANELY, 2003; DAS, PADAYATTI & PAULOSE, 1996).

É interessante associar o estudo de compostos antioxidantes, quimioterápicos e radioterápicos, pois seus mecanismos de ação, mesmo diferentes, cooperam para a elucidação do comportamento orgânico frente a substâncias naturais e sintéticas. Os antioxidantes, aplicados em pacientes que se submetem à radioterapia, conseguem minimizar alguns efeitos adversos, sem prejudicar o efeito da radiação sobre as células tumorais. Outros estudos teóricos demonstram que eles também aumentam a eficácia terapêutica dos antineoplásicos, ao bloquear o ciclo celular das células tumorais e conseqüentemente o crescimento da massa tumoral (BLOCK, 2004).

A fim de se avaliar a ação radioprotetora de compostos sintéticos ou naturais em animais, é preciso uma observação de pelo menos 30 dias após a irradiação. Deve ser particularmente avaliado, o epitélio gastrointestinal e as

células primitivas da hematopoese, pois são essenciais à manutenção da vida e bons indicadores da sobrevivência celular (JAGETIA; VENKATESH & BALIGA, 2004).

O efeito radioprotetor está relacionado com a via de administração usada pelos indivíduos consumidores de extratos, infusões e chás, pois em estudos experimentais foram observadas diferenças entre os grupos tratados por via intraperitoneal e via oral (gavagem). JAGETIA; VENKATESH & BALIGA (2004), em seus estudos evidenciaram uma melhor resposta nos animais tratados por via intraperitoneal, com 29% de sobrevivência, enquanto naqueles que receberam o extrato oralmente não houve percentual de sobreviventes, no período de 30 dias. No entanto, a via de administração oral prolonga o período de vida e os efeitos da irradiação, mas não consegue evitar a morte. Apesar disso, a maioria dos trabalhos sugere que os testes sejam realizados com a via oral, já que esta via é a mais utilizada pela população adepta ao uso dos produtos naturais.

Estudos *in vitro* avaliam a capacidade antioxidante de radiomodificadores, como também o desenvolvimento de novos compostos sintéticos e naturais com potente ação radioprotetora. Conforme MARTIN *et. al.* (2001), a metilproamina é um potente radioprotetor em relação ao composto [2-((aminopropyl)amino)ethanethiol] (WR 1065), composto com ação conhecida na literatura, em estudos *in vitro*. A metilproamina foi testada em células do tipo fibroblastos de hamster, classificadas como do tipo V79, demonstrando ação radioprotetora eficaz.

Para uma substância ser considerada eficiente como radioprotetora é preciso apresentar um Fator de Redução de Dose, discutido anteriormente, de 2,0 a 2,7 para a medula. Muitos compostos têm sido testados e dentre eles, a aminofostine (WR 2721), que é uma pró-droga, apresentou os melhores resultados, porém os ensaios biológicos permanecem na busca de minimizar os efeitos colaterais e tóxicos. É sabido, por exemplo, que a medula e as glândulas salivares ficam bem protegidas, porém o sistema nervoso não está incluído nesta proteção devido o caráter hidrofílico da WR 2721, e assim não atravessar com facilidade a barreira hematoencefálica e poder proteger esse sistema nobre para o organismo (HALL, 1994). A pró-droga WR 2721 pode ser ativada a nível da

membrana da fosfatase alcalina, tornando-se na droga WR 1065, já citada anteriormente (HOSPERS; EISENHAUER & VRIES, 1999).

Dentre os compostos com ação radioprotetora, as vitaminas também têm se mostrado eficazes. A vitamina E, estudada com esse intuito na reparação de feridas no tecido de ratos, apresenta uma resposta radioprotetora efetiva, quando utilizada na forma de alfa-tocoferol. Além disso, a vitamina E pode aumentar a capacidade do sistema de reparo orgânico a nível do ácido desoxirribonucléico, segundo MANZI, *et. al.* (2003).

LYUBIMOVA, *et. al.* (2001) avaliam, por sua vez, a ação radioprotetora do composto Hoechst 33342 sobre células endoteliais do cérebro de ratos e observa eficácia na análise *in vivo*, como também uma inibição da resposta apoptótica. No entanto, o Hoechst 33342 provoca radionecroses e paralisia; havendo a necessidade de novas investigações experimentais.

Com base no exposto, fica evidente a necessidade de estudar e buscar compostos que ofereçam propriedades radioprotetoras para beneficiar as aplicações da radiação ionizante na medicina. Essa linha de pesquisa vai promover um crescimento técnico-científico e ao mesmo tempo permitir o desenvolvimento de duas ferramentas importantes: os fitoterápicos e a radiação ionizante; para o benefício da população.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi encaminhado e autorizado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE), em 2004, sob o nº 178/04, cumprindo as normas para experimentação animal do Colégio Brasileiro para Experimentação animal e as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals, seguindo a lei de 9.605 – art. 32 e decreto 3.179 – art. 17 de 21/09/1999.

4.2 Animais

O estudo farmacológico com o extrato aquoso de folhas do Melão São Caetano foi realizado em camundongos albinos suíços, *Mus musculus*, machos e fêmeas, com 60 dias de idade, pesando entre 20 e 30g. Os animais foram cedidos pelo Biotério do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e permaneceram no Biotério do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, durante o período experimental. Os animais foram pesados e separados em lotes de 10-20 animais, os quais permaneceram em jejum “overnight” antes da realização de cada experimento, de acordo com as normas do Conselho Internacional para Animais de Laboratório Experimental (ICLAS). A via de administração da droga utilizada variou a depender do tipo de ensaio realizado, sendo utilizadas as vias intraperitoneal (ip) e oral ou gavagem (O)(<http://www.iclas.org/Documents.htm>).

Nas atividades relacionadas à biodistribuição, fragilidade osmótica, marcação de hemácias e proteínas plasmáticas foram utilizados ratos adultos *Wistar* adultos (90 dias de vida) machos com peso na ordem de 200 a 250 g, também cedidos e criados nas mesmas condições e dos mesmos Biotérios citados para o uso dos camundongos. Os animais receberam ração específica, labina/purina, e água *ad libitum*, e foram mantidos nas estantes em gaiolas a temperatura e umidade ambiente (22 ± 5 °C), com 12 horas de claro para cada 12

horas de escuro; os animais foram pesados e separados em lotes, os quais permaneceram em jejum “overnight” antes da realização de cada experimento.

É válido esclarecer que a decisão de usar camundongos ou ratos nos experimentos levou em consideração apenas as diretrizes do ICLAS, e o dimensionamento dos animais para adequar ao objetivo de cada experimento.

4.3 Preparação do extrato aquoso

As amostras da planta *Momordica charantia L.* (Melão São Caetano) foram coletadas no município do Cabo de Santo Agostinho – Pernambuco / Brasil. A espécie foi identificada no herbário Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco, sob registro de nº 43873, onde constou a seguinte informação:

Fam: *Cucurbitaceae*

Sp: *Momordica charantia L.*

Procedência: BR, PE, Cabo de Santo Agostinho (bairro: Enseada dos Corais)

Para preparação do extrato bruto, as folhas verdes foram selecionadas, lavadas com água destilada e trituradas. Foi realizada uma decocção, numa proporção de 1g de folhas para 5mL de água. Após resfriamento, em temperatura ambiente, o extrato foi filtrado e submetido à liofilização. Inicialmente foi realizada uma abordagem fitoquímica com a qual se pretendeu evidenciar a composição química do extrato aquoso em concentrações diferenciadas e foram determinados o pH do extrato e a coloração. Em seguida, o extrato aquoso das plantas estudadas foi preparado, gerando soluções de concentrações diferenciadas.

Nos animais do grupo controle foi utilizado solução salina NaCl a 0,9%. As doses foram calculadas e injetadas em função da massa corpórea do animal .

4.4 Determinação da toxicidade aguda (DL₅₀)

A determinação da toxicidade aguda é a primeira etapa de investigação toxicológica de uma substância desconhecida. É necessária a observação da atuação da droga sobre a fisiologia do organismo em estudo, para que deste modo se possa determinar a DL₅₀, sendo de primordial importância para o cálculo dos riscos de intoxicação aguda, além de servir de referência para os ensaios farmacológicos. O índice de toxicidade (DL₅₀), corresponde à concentração da substância que seja letal e capaz de matar 50% dos animais de um grupo em estudo.

Para a determinação da DL₅₀ foram realizados dois ensaios, um que determinou a maior concentração aplicada a qual não mate qualquer animal, e uma concentração menor capaz de matá-los. Após a determinação da DL₅₀, foram estabelecidas as concentrações intermediárias para a realização dos ensaios farmacológicos.

Durante os testes, foram administradas nos animais as concentrações pré-selecionadas (1000 mg/Kg, 700 mg/Kg, 500 mg/Kg e 250 mg/Kg), e o comportamento dos mesmos observados nos períodos de 2h, 24h e 48h, após a administração da droga. Os resultados foram calculados segundo a (Equação 2), sugerida por Souza (2001):

$$DL_{50} = \frac{D_f - \sum (a \times b)}{N} \quad (2)$$

Onde: N – número de camundongos / lote

D_f – dose numérica capaz de matar todos os animais

a – diferença entre 2 doses consecutivas

b – média de animais mortos entre 2 lotes consecutivos

4.5 Fracionamento e caracterização do extrato aquoso

A identificação do extrato aquoso foi realizada pela técnica de cromatografia, utilizando o gel Sephadex G-75 e tampões de eluição e a caracterização das frações obtidas no fracionamento utilizou a fotolorimetria (UV-280nm).

4.6 Controle radioquímico

Antes de utilizar o radiofármaco nos animais, foi avaliada a pureza radioquímica do radionuclídeo, através da técnica de cromatografia em placa, utilizando como solvente metil-etil-cetona para verificação da fração hidrofílica e o total das impurezas de tecnécio.

4.7 Avaliação hormonal e metabólica

Os animais foram separados em três grupos (n=5): controle, experimental A e experimental B. O grupo controle recebeu 0,25mL de solução salina a 0,9% e os grupos experimentais uma concentração de 30mg/kg do extrato aquoso de *Momordica charantia*; todos por via intraperitoneal, de maneira que os grupos experimentais A e B receberam a dose de forma aguda e foram mantidos sob tratamento por 2 horas e por 4 horas, respectivamente. Após os períodos de tratamento, os animais foram sacrificados, por inalação por clorofórmio, o sangue foi retirado por punção cardíaca e após centrifugação, o soro obtido para a realização das dosagens, (Figura 4).

As concentrações séricas do hormônio cortisol foram dosadas pelo método de radioimunoensaio (Kit cortisol Coat-a-Count - DPC) e a quantidade de radiação nos tubos do Kit foi medida em contador de radiações gama (DPC Gambyt CR). Da mesma forma, as concentrações séricas do hormônio insulina foram medidas, pelo método de radioimunoensaio, em condições semelhantes ao cortisol sérico. Já as variações metabólicas de glicose e cálcio, foram avaliadas através do método colorimétrico.

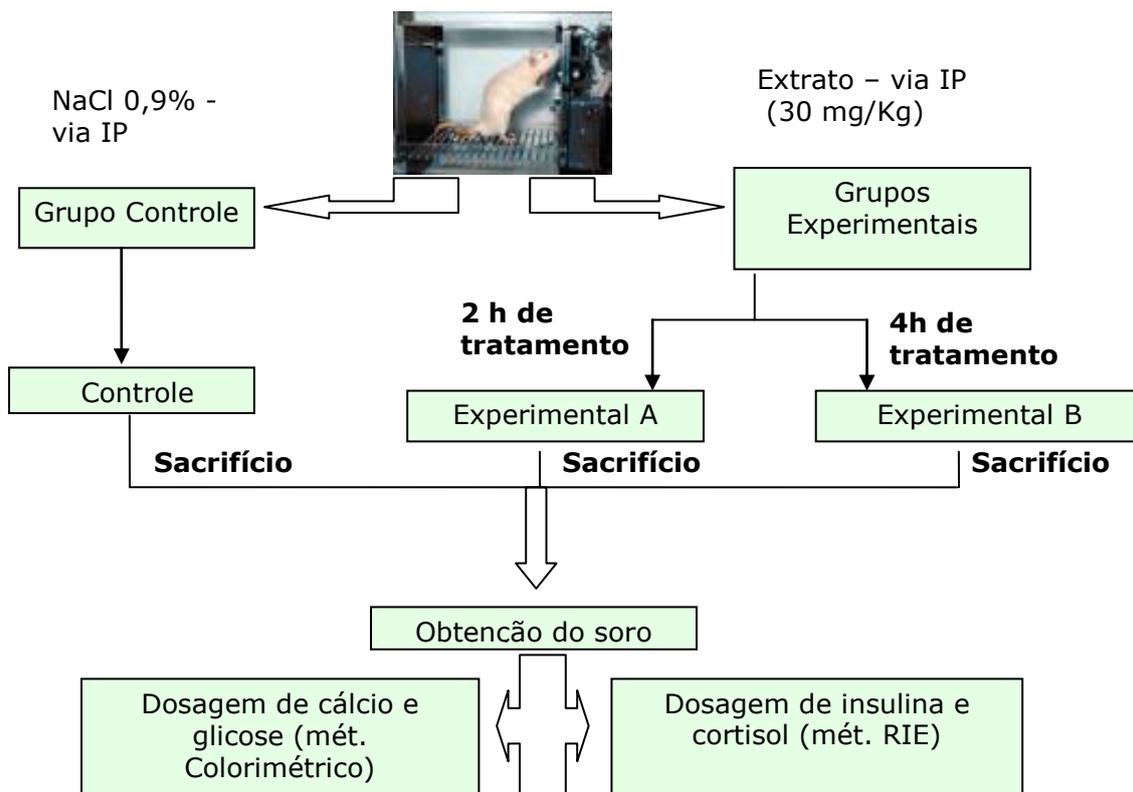


Figura 4– Procedimento experimental metabólico

4.8 Atividade antiinflamatória

A fim de avaliar as propriedades antiinflamatórias do extrato de Melão São Caetano, foram utilizados em média 12 animais (camundongos) para os grupos testes e o mesmo quantitativo para dois grupos controle, um utilizou o ácido acetil salicílico (AAS-controle positivo) e o outro, solução Salina (NaCl a 0.9%). A técnica aplicada fez uso de 0,1mL de solução aquosa 1%, numa relação volume/volume, de carragenina, a qual foi injetada na pata posterior esquerda de cada animal, para provocar a reação inflamatória. Após 30 min., cada grupo (3 animais) recebeu, por via ip, 30, 60, 100 e 250mg/kg de massa corporal do animal. Os animais controles receberam 0,5mL de solução salina, numa relação volume/volume, e 250mg/kg de AAS.

Após um período de 4 h da administração da droga, mantendo as mesmas condições da avaliação hormonal e metabólica, os animais foram anestesiados, sacrificados por inalação com clorofórmio, e suas patas posteriores retiradas para pesagem em balança analítica com precisão de 0,0001g. Os resultados foram analisados de acordo com o percentual de redução da inflamação, conforme a técnica proposta por LEVY (1969) e SRIVASTAVA *et al.*, (1987).

4.9 Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas

Na (Figura 5) pode-se observar um esquema ilustrativo da metodologia utilizada para a realização da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas. Esta técnica seguiu as sugestões descritas por BERNARDO-FILHO *et al.*, (1983) e BERNARDO-FILHO *et al.*, (1994) com pequenas modificações, conforme descrição a seguir. A marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com ^{99m}Tc foi realizada em sangue de ratos *Wistar* (n=5), colhido usando heparina como anticoagulante; as amostras (0,5mL) foram submetidas por 1h a 0,5mL do extrato nas seguintes diluições: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100%, numa relação volume/volume. Foram adicionados o cloreto estanoso (1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -500 μL), agente redutor, e, após 1h, 100 μL de ^{99m}Tc (3,7MBq) na forma de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$, incubando por mais 10 min à temperatura ambiente. Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas e precipitadas com ácido tricloroacético (5%), as frações solúveis (FS) e insolúveis (FI) separadas, tanto da hemácia quanto do plasma, e a radioatividade medida com o auxílio de um contador gama.

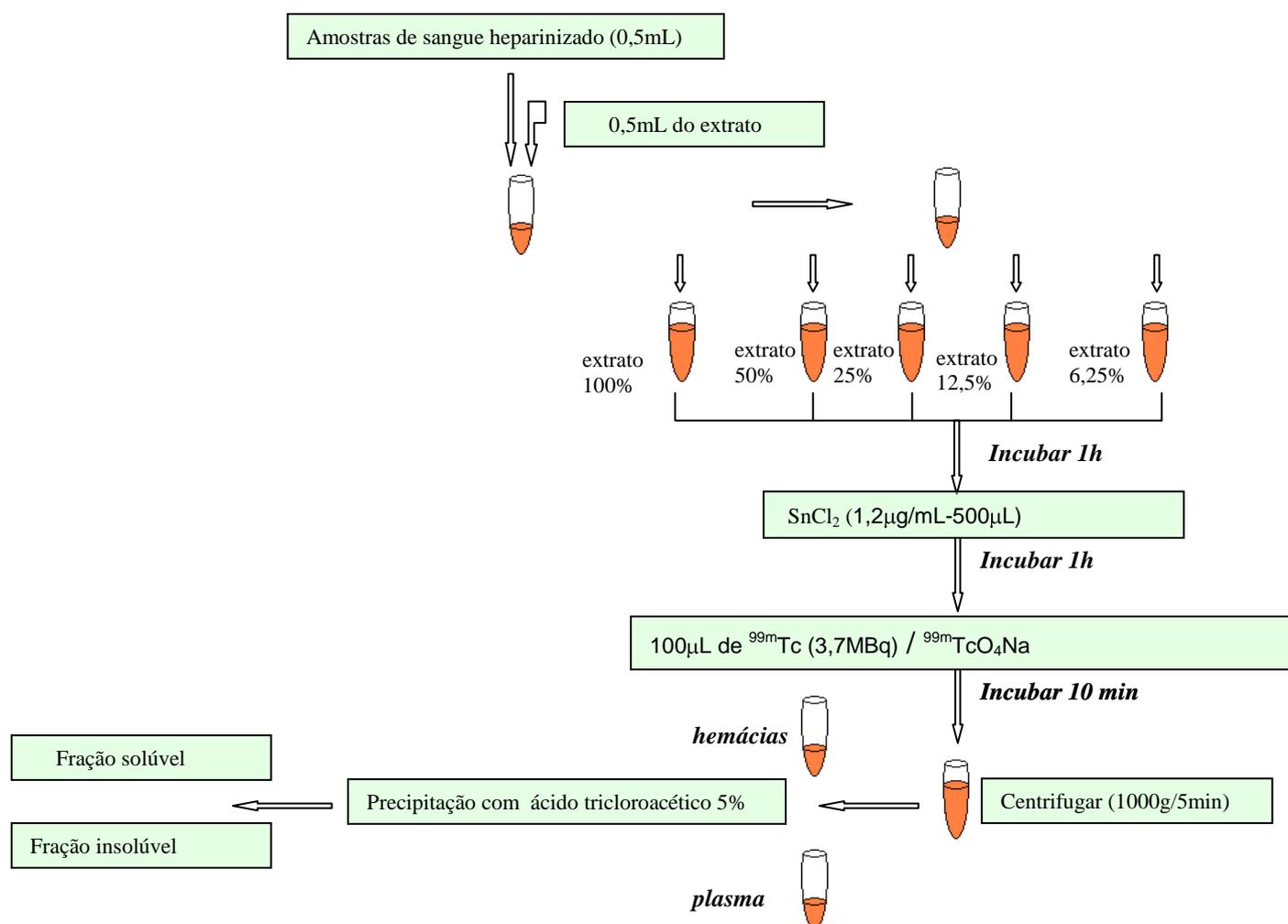


Figura 5– Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas

4.10 Fragilidade osmótica e morfologia das hemácias

Para avaliar a fragilidade osmótica, amostras de sangue de Ratos adultos *Wistar* adultos e sadios foram utilizadas. O sangue heparinizado (500µL) foi incubado por 1 hora na presença de 500µL do extrato bruto, em diferentes concentrações (0;10;50 e 100% volume/volume). Em seguida o sangue foi lavado por 2 vezes com solução salina (NaCl a 0,9%) para retirar o excesso de extrato e as alíquotas de células vermelhas do sangue (50µL) submetidas a um gradiente de NaCl (0%; 0,1%; 0,25%; 0,4%; 0,7% e 0,9%) por 1 hora. Após centrifugação (1000Gx5min), as densidades ópticas (DO) dos sobrenadantes isolados foram

determinadas em espectrofotômetro a 545nm, conforme Figura 6 (BERNARDO-FILHO, 2001). O percentual de fragilidade osmótica foi determinado considerando o valor obtido como densidade óptica no animal controle como equivalente a 100% de hemólise.

Em seguida, foi testado o comportamento morfológico das hemácias de ratos submetidas a diferentes concentrações do extrato, usadas no teste de marcação, na presença e na ausência do agente redutor cloreto estano (SnCl₂), e posteriormente comparadas com o grupo controle. As lâminas de sangue, ou seja, os esfregaços sanguíneos foram preparados, secos em temperatura ambiente, fixados, corados pelo Giemsa e a morfologia das hemácias avaliada em microscópico óptico (x100), da Leica.

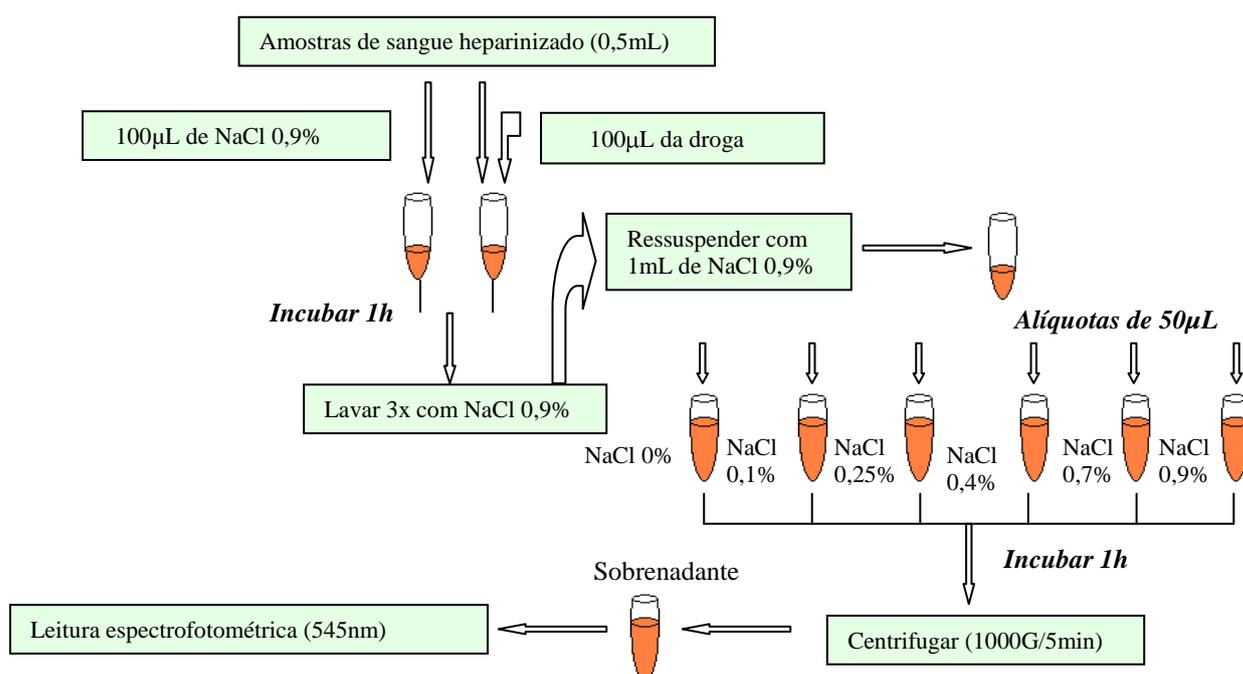


Figura 6– Procedimento da técnica de fragilidade osmótica

4.11 Biodistribuição

Os estudos de biodistribuição foram realizados em ratos adultos *Wistar*, em duas situações: aguda e crônica. No estudo agudo foram seguidas as mesmas condições dos grupos experimentais A e B citados na avaliação hormonal e metabólica. Já no estudo crônico, os animais receberam o extrato por via oral (gavagem) durante 10(dez) dias.

Após o tempo de tratamento, nos grupos do estudo agudo (2h e 4h), e no 11^o dia, no grupo do estudo crônico, os animais receberam por via retro-ocular uma solução de $\text{NaTc}^{99\text{m}}\text{O}_4$ (3,7 MBq) e após 30min., foram anestesiados e sacrificados para retirada dos órgãos (coração, pulmões, fígado, estômago, baço, pâncreas, rins, intestinos, testículos, osso, músculo, tireóide e cérebro), os quais foram dessecados, lavados e a radioatividade de cada órgão medida. Além disso, todos os órgãos foram pesados para estabelecer o %captação/g. A Figura 7 apresenta uma ilustração que representa o método explicitado.

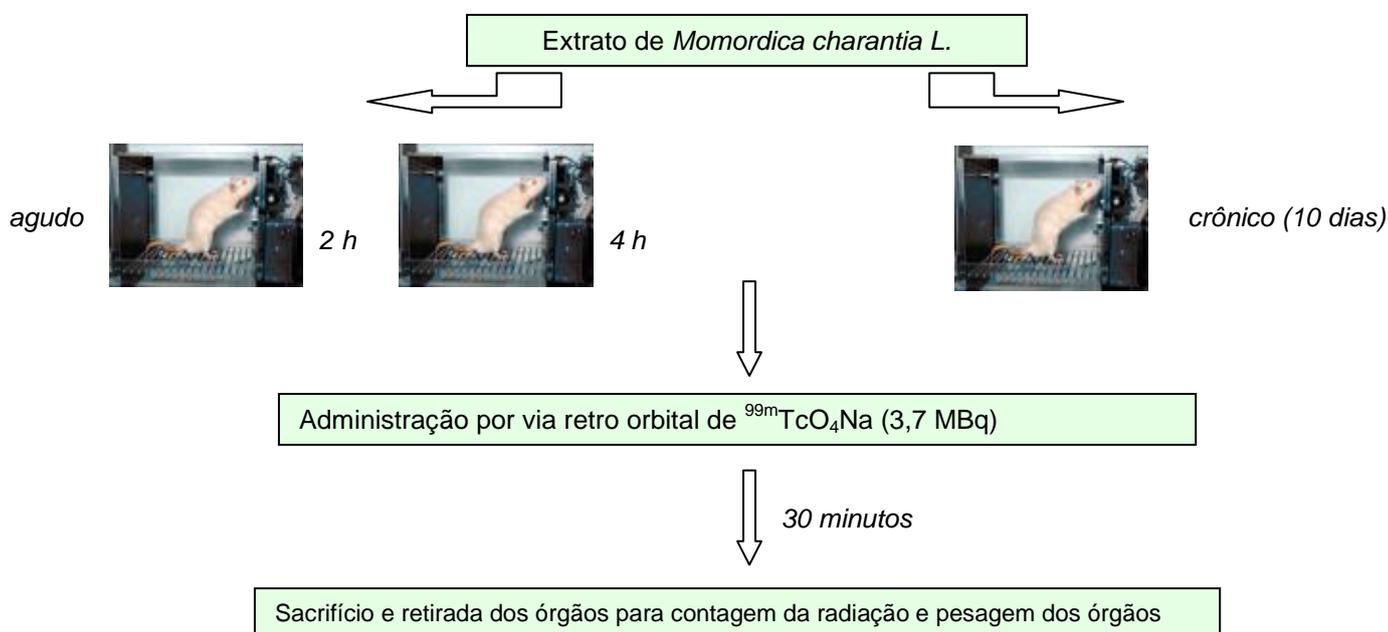


Figura 7– Etapas da biodistribuição

4.12 Análise Estatística

Para análise dos resultados obtidos nos experimentos foi utilizado o teste T de Student, considerando os resultados significativos à análise de variância ($p < 0,05$). É importante citar que todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito no capítulo anterior, neste trabalho, para avaliar o papel radioprotetor da *Momordica charantia L.*, primeiro foi avaliada a DL₅₀ do extrato aquoso das folhas, para medir a toxicidade aguda do extrato, depois foi realizada a técnica de cromatografia de filtração para caracterizar e purificar o extrato aquoso da *Momordica charantia L.* e a cromatografia em placa para possibilitar o controle radioquímico do ^{99m}Tc. Em seguida, observou-se a ação do extrato sobre o metabolismo bioquímico e hormonal, seu potencial antiinflamatório, o efeito sobre as hemácias e proteínas plasmáticas, nas frações solúveis e insolúveis, bem como sobre a morfologia das hemácias, e o comportamento biológico em ratos Wistar. Assim, para proporcionar uma abordagem didática dos resultados, já que vários aspectos foram estudados, os mesmos foram apresentados em cinco momentos, que seguem abaixo.

5.1 Caracterização preliminar

A concentração letal para 50% dos camundongos (DL₅₀) foi determinada, ao tratar os animais por via intraperitoneal com o extrato bruto da *Momordica charantia L.*, sendo o valor encontrado de 500mg/kg de peso. As concentrações acima de 500mg/kg de peso apresentaram mortalidade acima de 50%, chegando a 100% de mortalidade em 1000mg/kg. Os sintomas desenvolvidos após uma hora da administração intraperitoneal incluem: pêlos eriçados, contrações abdominais, taquicardia, diminuição da resposta a estímulos e letargia, evoluindo para morte num período de até 24h. Já as concentrações a partir de 250mg/kg provocaram sintomas de dor menos acentuados e menos duradouros.

A caracterização do extrato aquoso de *Momordica charantia L.* foi realizada por fracionamento, através de técnica de cromatografia em coluna em Sephadex G75. A leitura das frações do extrato, em espectrofotômetro a 280nm, revelou dois picos de absorvância, conforme Figura 8. As moléculas que têm absorvância característica em 280nm costumam ser frações peptídicas, e neste trabalho ficou caracterizado dois picos mais expressivos no material do extrato que se comportou com aspectos protéicos também. De fato algumas proteínas já foram

relatadas como constituintes do extrato da *Momordica charantia*, tais como a proteína denominada MAP 30 por LEE-HUANG *et al.* (1994), a proteína denominada MRK 29 por JIRATCHARIYAKUL *et al.* (2001) e o peptídeo similar à insulina bovina referido por WELIHINDA *et al.* (1982). Esses trabalhos reforçam as expectativas deste estudo, de que moléculas de caráter protéico estejam presentes nas referidas frações e confirmam as atividades biológicas do extrato.

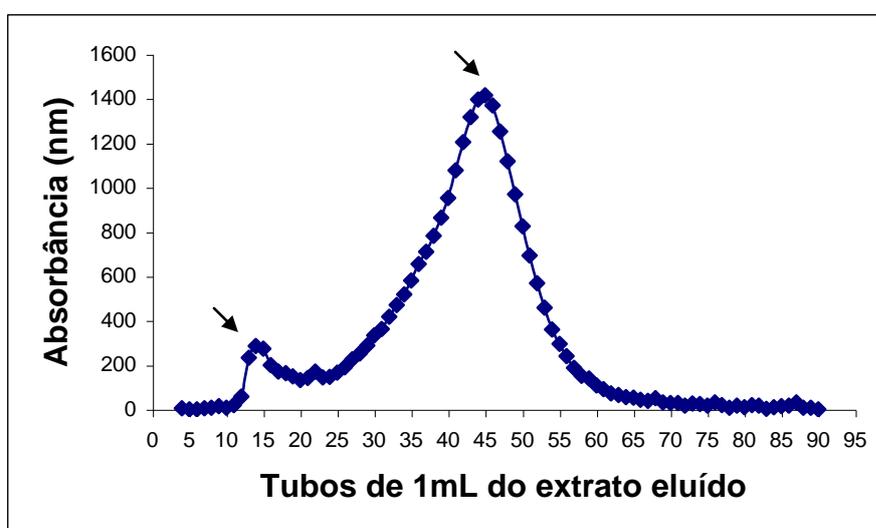


Figura 8- Perfil do extrato aquoso de *Momordica charantia* L.

A fim de realizar o controle radioquímico, a técnica de cromatografia em placa foi utilizada, segundo o método descrito anteriormente. Este teste é importante, pois a presença de impurezas radioquímicas resulta na perda de qualidade da imagem devido ao alto valor do “branco” ou radiação de fundo (*background*) dos tecidos vizinhos e do sangue.

A curva formada a partir da cromatografia em placa do pertecnetato reduzido por cloreto estanoso (Figura 9) mostra que o pertecnetato não foi bem reduzido pelo agente redutor SnCl_2 , pois não existe um pico formado e sim uma área de possível redução. Nesta, percebeu-se uma distribuição do pertecnetato por diferentes estados de oxidação ao longo da placa, já que o mesmo admite de -1 até +7. Essa hipótese pode ser confirmada na Figura 10, onde temos uma

curva representando o comportamento do pertecnetato livre. É mostrado que o pertecnetato livre apresenta um pico ideal ou preferencial para marcação, diferentemente dos dados comentados na Figura 9. Em ambas as Figuras está sendo observado o percentual de ligação dos compostos estudados em relação ao fator de referência (Rf), o qual é definido como a razão entre a distância percorrida pelo componente e a distância percorrida pelo sistema de eluição desde o ponto de aplicação (SAHA, 1998).

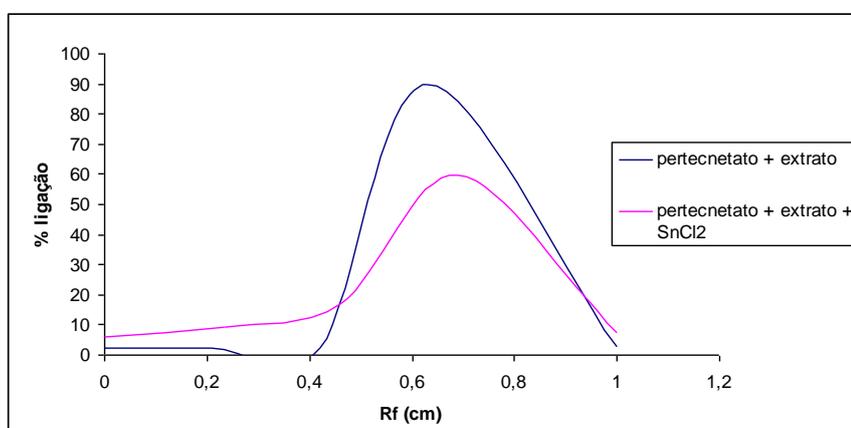


Figura 9- Cromatograma do extrato marcado.

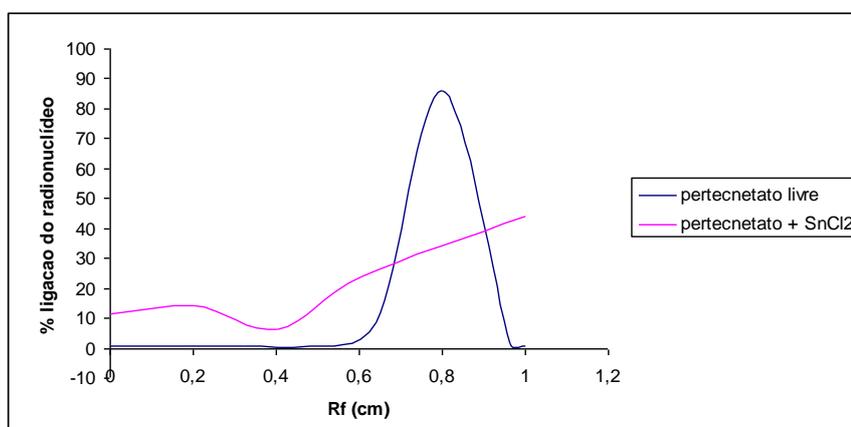


Figura 10- Cromatograma do pertecnetato livre e reduzido.

5.2 Caracterização metabólica

Na avaliação da ação do extrato aquoso da *Momordica charantia L.* (MC) no metabolismo, foram medidos a concentração sérica de glicose, insulina e cálcio. Para o estudo desses parâmetros, os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle, que recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e os grupos experimentais que receberam o extrato na concentração de 30mg/ml, sendo o grupo A tratado por 2 horas e o grupo B tratado por 4 horas, de forma aguda. A dosagem de glicose foi realizada a partir de teste colorimétrico com leitura no espectrofotômetro a 505 nm, a dosagem de insulina foi realizada pela técnica de radioimunoensaio e a dosagem de cálcio por técnica colorimétrica, conforme já descrito no capítulo de material e método.

A caracterização metabólica é importante pois permite avaliar a concentração de glicose sérica e de outras substâncias endógenas diretamente ou indiretamente relacionadas à glicose. Isto porque a glicose é promotora de “stress” oxidativo no organismo, o qual pode gerar alterações fisiopatológicas importantes e que podem ou não ser corrigidas pelo sistema antioxidante endógeno (RAZA et. al., 2000).

A Figura 11 mostra a variação da glicose sérica nos dois grupos experimentais e no grupo controle. No grupo controle foram observados valores médios de 120,8 mg/dL ($\pm 14,0$) e nos grupos A e B valores na ordem de 59,96 ($\pm 12,5$) e 110,9 mg/dL ($\pm 14,9$) respectivamente. Todos os resultados estão sendo apresentados acompanhados dos seus desvios-padrão.

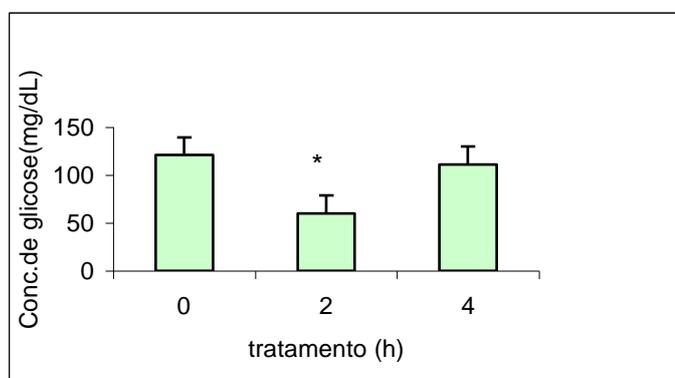


Figura 11- Variação da glicose sérica (n=5), * $p \leq 0,05$.

Ao analisar os valores obtidos foi possível observar que no grupo experimental A houve uma redução significativa de 50,4% na glicose sérica, contudo no grupo experimental B, esses valores tenderam a retornar àqueles encontrados no grupo controle.

A Figura 12 mostra a variação de insulina sérica obtida nos mesmos grupos citados para as concentrações de glicose. Os resultados revelaram no grupo controle valores médios de 16,4 UI/mL ($\pm 0,57$) e nos grupos experimentais A e B valores de 56,83 UI/mL ($\pm 3,2$) e 217,6 UI/mL $\pm (12,2)$, nesta ordem. Todos os resultados estão sendo apresentados acompanhados dos seus desvios-padrão.

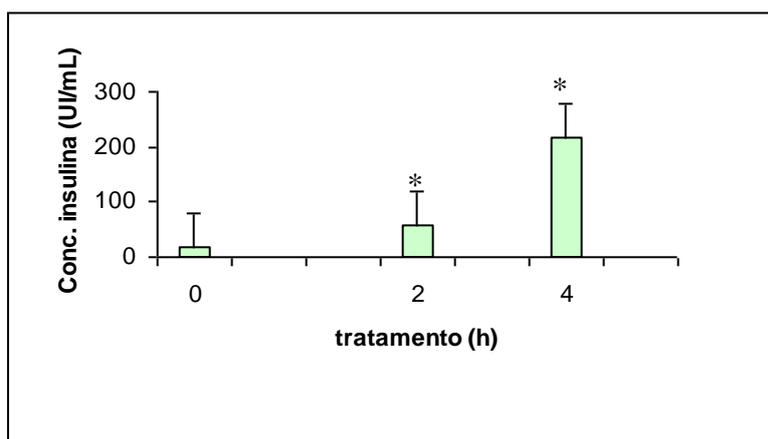


Figura 12- Variação da insulina sérica (n=5),
* $p \leq 0,05$.

Os valores encontrados mostraram um aumento na concentração sérica de insulina de 246,0% no grupo experimental A e de 1225,0% no grupo experimental B, ambos significativos.

A ação hipoglicemiante da *Momordica charantia L* tem sido explicada por várias suposições e hipóteses. DAY *et al.* (1990) apresentaram a hipótese que a administração oral da planta reduz a glicose sérica independentemente da absorção intestinal de glicose, sugerindo assim um mecanismo de ação não relacionado ao pâncreas.

O extrato alcoólico da polpa do fruto da *Momordica charantia* promove uma redução da glicose plasmática não acompanhada de aumento na secreção de insulina. SARKAR; PRANAVA & MARITA, (1996) acreditam que o provável mecanismo de ação seja decorrente do aumento da utilização de glicose no fígado antes que se efetue a secreção de insulina.

Já o extrato aquoso do fruto, usado por administração oral, reduz o nível de glicose no sangue de camundongos KK-Ay, um modelo de animal portador de diabetes tipo II. Além disso, o mesmo, causa hiperinsulinemia no mesmo modelo animal, mas não altera a concentração de insulina, nos animais normais; sugerindo que o decréscimo na resistência à insulina deva-se ao aumento da proteína GLUT-4 (MIURA *et al.*, 2001).

Segundo VIRDI *et al.*, (2003), o uso do fruto fresco imaturo reduz em 48% a glicose do sangue dos animais diabéticos e, pode ainda atuar sinergicamente com os exercícios físicos para normalizar a glicemia no segundo modelo de animal (MIURA *et al.*, 2004). Acredita-se ainda que o fruto possui um ativador de PPAR alfa (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) que atua associado a genes de metabolismo lipídico (CHAO & HUANG, 2003).

Em nossos resultados, ao avaliar a concentração de glicose sanguínea, é possível propor que a variação de glicose e insulina apresentada em função do tempo de tratamento não é unidirecional. Isto porque, no grupo tratado por 2 horas, ocorreu uma redução na glicose sérica e um aumento na concentração de insulina. No entanto, no grupo experimental B, tratado por 4 horas, os valores de glicose retornam praticamente aos níveis do controle e esse comportamento fisiológico não é acompanhado pela concentração de insulina sanguínea.

GROVER *et al.* (2002), relatam que ao administrar diferentes extratos da *Momordica charantia L.* por via oral encontrou um efeito hipoglicemiante sem alterar a concentração de insulina. Trabalhos do mesmo grupo também observaram que o extrato aquoso da *Momordica charantia* melhora o teste de tolerância à glicose, após 8 horas de tratamento, em ratos normais e reduz em 50% a hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por streptozocin (STZ). Em outro estudo, quando se realizou a administração crônica oral do extrato de *Momordica charantia* durante 13 dias consecutivos, observou-se uma melhora nos valores do teste de tolerância à glicose, sem promover alterações na

concentração sérica de insulina. Acredita-se que esses resultados ocorrem devido à inibição das enzimas glicose-6-fosfato e da frutose-1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfato-dehidrogenase no fígado.

Com base no exposto, foi possível propor que o extrato aquoso bruto das folhas de *Momordica charantia* L., na concentração estudada, apresentou um efeito farmacológico acentuado sobre a concentração de insulina sérica, reduzindo a concentração sérica de glicose, de maneira que se acredita existir um princípio ativo no extrato promovendo a liberação da insulina pelas células beta-pancreáticas.

A Figura 13 apresenta a concentração de cálcio sanguíneo nos mesmos grupos avaliados para a glicose e insulina. Os resultados revelaram no grupo controle valores médios de 8,85 mg/dL ($\pm 0,9$) e nos grupos experimentais A (2 horas) e B (4 horas) valores de 13,56 mg/dL ($\pm 0,1$) e 13,47 mg/dL ($\pm 0,3$), nesta ordem. Os níveis séricos de cálcio, de acordo com os resultados obtidos, aumentaram significativamente em relação ao controle. No decorrer do tratamento, a concentração do cálcio manteve-se estável entre 2h e 4h de tratamento, mas ambas acima dos níveis de cálcio encontrados no soro dos animais não tratados com o extrato de *Momordica charantia* L. Todos os resultados estão sendo apresentados acompanhados dos seus desvios-padrão.

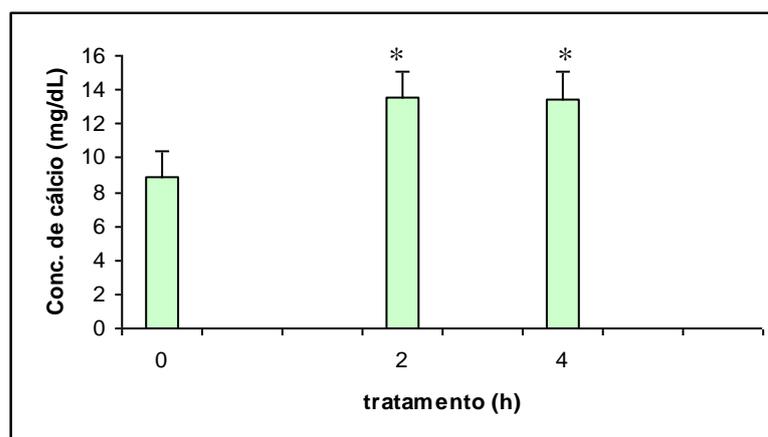


Figura 13- Variação do cálcio sérico (n=5),
* $p \leq 0,05$.

Diante da observação de que os compostos ativos não caracterizados do extrato aumentam a eficiência de armazenamento de glicose pós-prandial no músculo e no fígado, e diminuem a excreção de glicose hepática, efeitos comparáveis aos da metformina, conforme MC CARTY (2004), uma hipótese possível para explicar essa observação foi que o extrato da planta apresente um ativador da enzima AMP quinase.

WELIHINDA *et. al.* (1982), afirmaram que a estimulação da insulina liberada pelo extrato de *Momordica charantia L.* foi parcialmente reversível. Esta secreção difere daquela observada no comportamento da D-glucose e outros secretagogos de insulina comumente empregados. O mesmo grupo mostrou que a concentração de insulina, não foi suprimida pela L-epinefrina e que nem sempre foi potencializada pela remoção de Ca^{2+} , que é um comportamento fisiologicamente esperado. Essa hipótese justifica o aumento da concentração sérica de Ca^{2+} no nosso trabalho.

5.3 Propriedades antiinflamatórias

Nesta etapa, avaliou-se o efeito do extrato das folhas da *Momordica charantia L.* sob diferentes concentrações no modelo inflamatório do edema de pata induzido por carragininina, usando o ácido acetil salicílico (AAS) como controle positivo. A Figura 14 apresenta o percentual de inflamação após 4h de indução do edema de pata com carragininina nos animais tratados com o extrato, em diferentes concentrações.

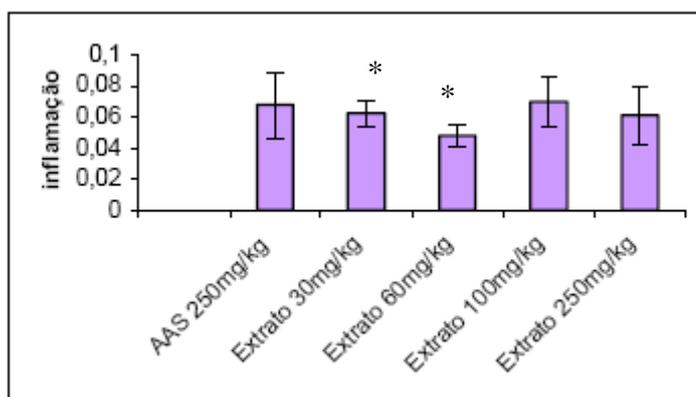


Figura 14 – Atividade inflamatória do extrato aquoso de *Momordica charantia*.

A atividade antiinflamatória foi avaliada considerando 100% de inflamação no grupo controle (NaCl 0,9%), com a resposta antiinflamatória sendo obtida pela diferença dos dados encontrados nos demais grupos em relação ao grupo controle. Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) no edema de pata (71%) induzida pela administração de AAS 250mg/kg. A administração do extrato de *Momordica charantia* L. numa concentração de 30mg/kg, usando a via intraperitoneal, promoveu uma redução significativa no edema de 66%, resultados já equivalentes àqueles promovidos pelo controle positivo, ou seja, o AAS.

Neste contexto, se os resultados obtidos com a administração do extrato forem comparados aos dados em relação à administração de ácido acetilsalisílico (AAS), observa-se que o extrato da *Momordica charantia* apresenta uma tendência de proporcionar uma melhor atividade antiinflamatória, mas que não se reflete em diferenças significativas ($p < 0,05$). O melhor resultado foi obtido utilizando-se uma concentração de 60mg/kg, na qual se obteve uma redução em 50% do edema de pata.

Concentrações maiores de *Momordica charantia* não sugerem elevação na resposta antiinflamatória, ao contrário, parecem ser menos eficientes. Valores na ordem de 100mg/kg reduzem o edema para 73%, mas não expressam diferença significativa em relação ao controle, e a concentração de 250mg/kg reduz para 64%, de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, no entanto nenhuma representou diferença em relação ao AAS, estatisticamente.

O edema de pata induzido pela carragininina tem sido comumente utilizado como um modelo experimental animal para inflamação aguda, que se acredita ser bifásica. A fase que compreende as duas primeiras horas do modelo com carragininina é provavelmente mediada por histamina, serotonina e aumento na síntese de prostaglandinas nos tecidos afetados. A fase seguinte é provida pela liberação de prostaglandina e mediada por bradicininas, leucotrienos e células polimorfonucleares, produzidas por macrófagos teciduais (DONGMO *et al.*, 2005).

A atividade inibitória do extrato das folhas de *Momordica charantia* após quatro horas da indução do edema de pata, na segunda fase do modelo, não se mostrou dose-dependente. Ao se observar a curva dose-resposta, (Figura 15), as concentrações experimentais maiores que 60mg/kg não deflagram uma redução maior na massa da pata dos camundongos. A curva parece atingir um platô no

qual a redução do edema de pata se estabiliza e a resposta biológica não varia mais em função da concentração administrada.

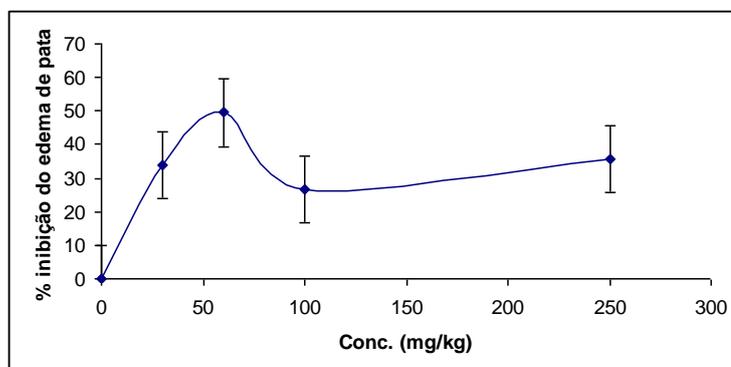


Figura 15- Curva dose x resposta antiinflamatória (n=5), * $p \leq 0,05$.

Por outro lado, ao se determinar por radioimunoensaio (RIE) a concentração sérica do hormônio cortisol em ratos normais tratados com o extrato aquoso das folhas de *Momordica charantia* observou-se uma redução de seus níveis séricos.

A concentração sérica do cortisol decresceu significativamente, tanto no grupo experimental A – 2 horas (83%) quanto no grupo experimental B – 4 horas (88%), após duas horas e quatro horas de administração intraperitoneal (ip) do extrato da planta, respectivamente; comparados aos percentuais dos animais controle, que receberam NaCl 0,9%, (Figura 16).

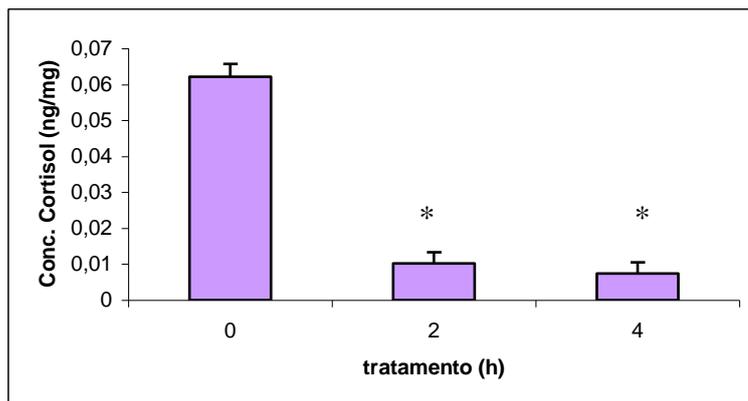


Figura 16- Concentração do cortisol sérico (n=5), * $p \leq 0,05$.

Sabe-se que o extrato do fruto da *Momordica charantia* é capaz de estimular a liberação de insulina pelo pâncreas (SITASAWAD, SHEWADE & BHONDE, 2000), e reduzir os níveis plasmáticos de glicose em situações de diabetes tipo 2 (AHMAD *et al.*, 1999). Estudos anteriores revelaram a capacidade da planta em intensificar a redução de glicose também em animais saudáveis (DAY *et al.*, 1990) o que, talvez, influencie a inibição de cortisol.

Outros estudos têm demonstrado a atividade antiinflamatória da planta. Foi relatado que a dieta com a *Momordica charantia* pode induzir a resposta antiinflamatória *in vivo*, e que o seu extrato digerido é capaz de aumentar a secreção de interleucina 10 (IL-10) e de citocinas proliferativas como o fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) e diminuir a secreção de interleucina 7 (IL-7) *in vitro* em células do epitélio intestinal (MANABE *et al.*, 2003). Foi reportada a ação da *Momordica charantia* de forma coadjuvante a outros compostos no tratamento de inflamações: a MAP-30, uma proteína extraída de sementes de *Momordica charantia*, mostrou-se capaz de potencializar a atividade antiinflamatória e antiviral de drogas como a dexametasona e a indometacina (BOURINBAIAR & LEE-HUANG, 1995).

Neste trabalho, quando da administração do extrato da planta, observou-se uma redução da concentração de cortisol nos grupos tratados por 2 horas(A) e por 4 horas(B), significativamente, com relação ao grupo controle. Essa redução pode dever-se a liberação de insulina e redução dos níveis de glicose, de maneira que o cortisol permaneça reduzido.

Como se acredita que o cortisol exerce um papel durante o processo inflamatório, o extrato estudado nesse trabalho parece não atuar na inflamação pelo mesmo mecanismo que o hormônio em questão. Essa hipótese vem do fato do cortisol ser liberado, por ser um hormônio com propriedades antiinflamatórias, e provavelmente, participar do mecanismo de inibição dos mediadores inflamatórios. Acredita-se que o sítio de inflamação envie sinais ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal culminando com a secreção de cortisol. Além disso, os glicocorticóides são agentes efetivos no controle da inflamação crônica através da interação com receptores específicos que resulta na modulação de diversos genes envolvidos na resposta antiinflamatória (ROOK, 1999; SANTINI *et al.*, 2001).

A observação de que o extrato da *Momordica charantia* foi capaz de reduzir os níveis séricos de cortisol em animais normais leva a crer que sua ação antiinflamatória possa não se relacionar com a modulação do hormônio. No entanto, ainda não há dados experimentais que permitam relacionar a atividade da *Momordica charantia* com o nível sérico do cortisol no decorrer da inflamação.

5.4 Ação do extrato sobre o tecido hematopoiético

Num terceiro momento, avaliou-se a ação do extrato aquoso da *Momordica charantia* L. (MC) sobre a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas, sobre a fragilidade osmótica e sobre a morfologia das células sanguíneas.

A Figura 17 apresenta o percentual de captação do radionuclídeo no plasma e nas hemácias em amostras de sangue tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *Momordica charantia*.

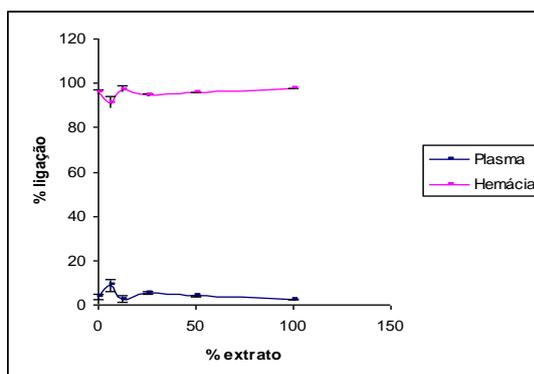


Figura 17- Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas (n=5), * $p \leq 0,05$.

A Figura 18 mostra a captação do radionuclídeo nas frações insolúveis do plasma e das hemácias, obtidas com a ajuda do ácido tricloroacético.

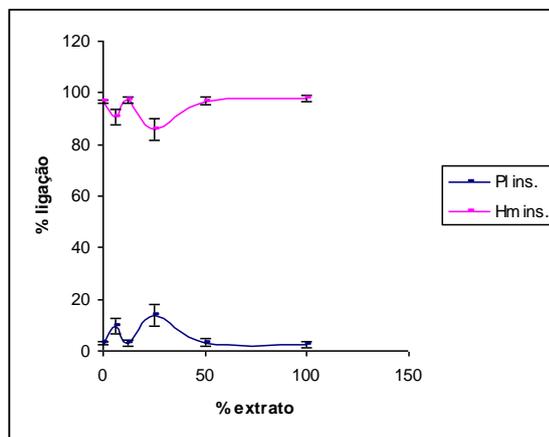


Figura 18- Marcação da fração insolúvel de hemácias e proteínas plasmáticas (n=5), * $p \leq 0,05$.

Os resultados, observados nas Figuras 17 e 18, demonstraram que, em relação à marcação de hemácias e de proteínas plasmáticas, não há mudanças significativas no perfil das amostras controle e das amostras tratadas com extrato de *Momordica charantia*, isto é, não existem variações em seus percentuais de ligação com ^{99m}Tc , as hemácias permaneceram com ligação em torno de 97% e a ligação às proteínas plasmáticas, em torno de 3%.

Medicamentos ou substâncias presentes na corrente sanguínea podem, interagir com os constituintes do sangue e promover, desta forma, alteração no processo de marcação atuando como: agente oxidante ou antioxidante. Isto pode acontecer se houver competição com cloreto estano (SnCl₂) ou com o ^{99m}Tc ; alteração na permeabilidade da membrana celular, facilitando ou bloqueando o mecanismo de transporte dos elementos; ocupação do sítio de ligação no ^{99m}Tc ou se o SnCl₂ facilitar o processo de ligação ^{99m}Tc com as proteínas plasmáticas. O efeito oxidante impede a redução do ^{99m}Tc devido à oxidação do íon estano, impedindo a captação do pertecnetato pela hemoglobina, desta forma diminuindo a eficiência de marcação. Por outro lado, o efeito antioxidante aumenta a eficiência de marcação das hemácias (SANTOS, 1995; REINIGER, 1999).

O resultado obtido para a *Momordica charantia*, neste trabalho, indica que as células submetidas ao extrato não sofreram alterações nos mecanismos de ligação com ^{99m}Tc , o mesmo aconteceu no plasma. O extrato de *Momordica charantia* parece não interferir na capacidade do cloreto estano em reduzir o pertecnetato em tecnécio, sendo um indício de que não funciona como um agente oxidante, ou seja, um agente que modifique a captação de ^{99m}Tc nas hemácias.

Outras substâncias naturais promovem efeitos semelhantes. O estudo do efeito da planta *Paullinia cupana*, popularmente conhecida como guaraná, muito usada como estimulante de efeitos musculares e mentais, foi realizado por OLIVEIRA *et. al.*, (2002). O uso da solução do guaraná na concentração de 200mg/mL promoveu uma redução significativa da captação de ^{99m}Tc nas hemácias, como também no percentual de fixação das frações solúveis e insolúveis das hemácias, não só na concentração citada anteriormente, como também nas concentrações de 20, 30, 50 e 100mg/mL.

Já OLIVEIRA *et. al.*, (2003), ao estudar a ação da alga *Fucus vesiculosus*, usando sua forma farmacêutica em cápsulas já comercializada, reconstituídas em solução salina, nas concentrações de 30, 50, 100 e 200mg/mL; observaram uma redução significativa no percentual de captação do ^{99m}Tc nas hemácias. Além disso, perceberam uma alteração significativa na quantidade do radionuclídeo fixada nas frações insolúveis tanto de hemácias quanto de plasma nas amostras tratadas pela alga. O *Pneumus boldus* é uma planta medicinal originária do Chile, usada muito na forma de infusão, pode ser hepatotóxica e lesiva ao sistema nervoso, contudo é muito utilizada no combate de distúrbios gastrointestinais. A ação desta planta sobre a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas mostrou um aumento na captação de ^{99m}Tc nas hemácias (REINIGER *et. al.*, 1999). Os resultados obtidos no nosso trabalho, em comparação com esses apresentados, não estão concordantes quanto às propriedades encontradas nestas outras plantas estudadas.

A avaliação da fragilidade osmótica tende a mensurar a influência do extrato na membrana das hemácias de maneira qualitativa. Neste trabalho, as concentrações do extrato de *Momordica charantia* estudadas, não parecem promover alterações na osmolaridade das hemácias em relação ao grupo controle. A porcentagem de fragilidade osmótica foi determinada considerando

100% a densidade óptica para o grupo controle, ou seja, livre de tratamento. No entanto, o extrato na concentração de 100% promoveu hemólise nas concentrações utilizadas de solução salina (NaCl), aproximando-se da isotonicidade fisiológica, conforme Figura 19. Ao observar a Figura 19, é importante lembrar que cada linha representa o comportamento respectivo a uma diluição do extrato bruto, sendo o grupo A 10% de extrato, o grupo B 50% de extrato e o grupo C 100% de extrato.

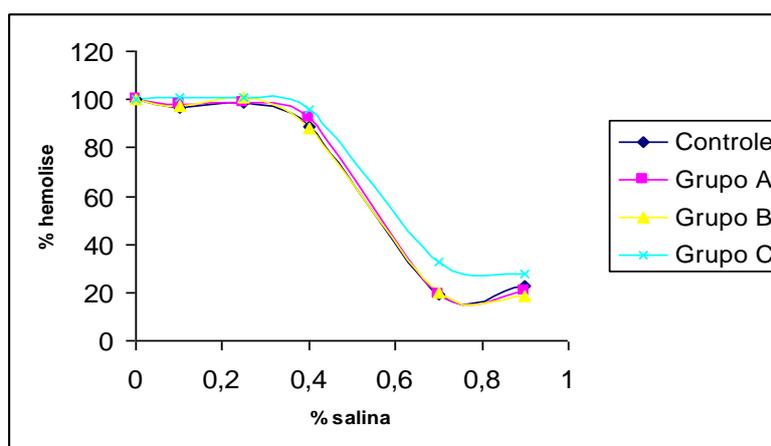


Figura 19: Comportamento do extrato aquoso da *Momordica charantia* sobre a fragilidade osmótica

Diferente da introdução do agente redutor cloreto estânico (SnCl_2) que é capaz de oferecer algum mecanismo de proteção à membrana, em meio hipotônico, já que aumenta a osmolaridade do meio (BERNARDO-FILHO *et. al.*, 2001), o extrato aquoso da *Momordica charantia* não promoveu alteração na fragilidade osmótica em relação ao grupo controle, exceto na concentração de 100% v/v. Isto porque nesta concentração foi possível observar um percentual de hemólise superior, especificamente próximo à isotonicidade fisiológica.

A fim de completar a avaliação qualitativa, esfregaços sanguíneos foram realizados para proporcionar uma comparação morfológica entre as hemácias submetidas às diferentes concentrações do extrato (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%), Figura 20.

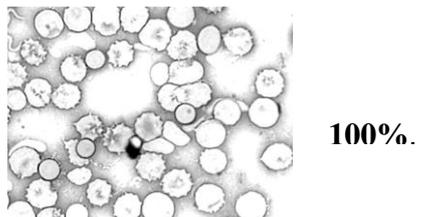
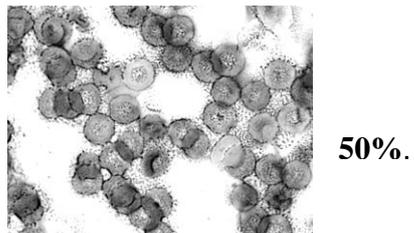
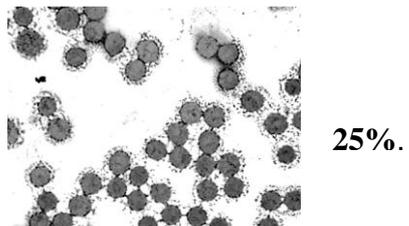
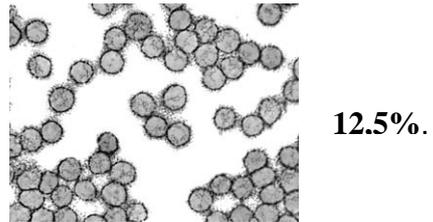
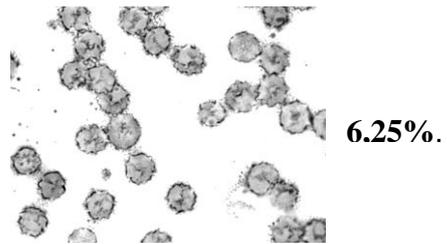
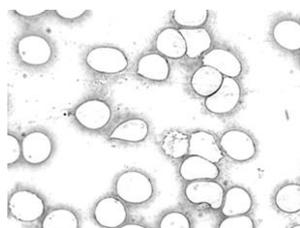


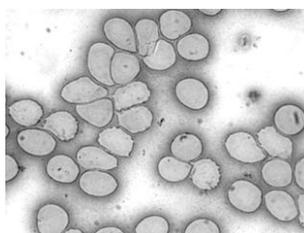
Figura 20: Efeito do extrato de *Momordica charantia* L.sobre a morfologia das hemácias

Ao observar a Figura 20 podemos observar que as hemácias do grupo tratado com as diferentes concentrações do extrato, apresentam-se com perda de conteúdo hemoglobínico e discretas alterações na membrana celular à proporção que o extrato fica mais concentrado (100%).

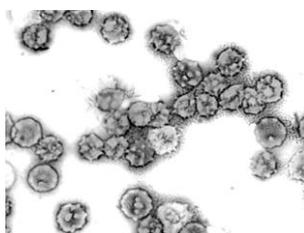
Como o nosso intuito também foi comparar a ação do extrato e do cloreto estano, quanto ao potencial redutor, a nível morfológico; outros esfregaços sanguíneos foram realizados na presença do pertecnetato livre e pertecnetato reduzido por cloreto estano, Figura 21.



Controle



Pertecnetato livre



**Pertecnetato
reduzido**

Figura 21- Efeito do extrato de *Momordica charantia L.* sobre a morfologia das hemácias controle e com pertecnetato.

O comportamento morfológico das células vermelhas do sangue é um reflexo da capacidade das hemácias de captar o ^{99m}Tc (OLIVEIRA *et. al.*, 2000). Ao se observar a Figura 21, pode-se perceber que o esfregaço realizado a partir da amostra de sangue heparinizado associado ao pertecnetato reduzido tem aspectos morfológicos semelhantes ao esfregaço de sangue com o extrato, sobretudo na concentração de 12,5%. Essa observação sugere a hipótese que o extrato pode agir como agente redutor, assemelhando-se ao cloreto estanoso, com melhor resposta nesta concentração citada. Hipótese essa, confirmada pelos resultados obtidos nos testes de marcação de hemácias, de fragilidade e no cromatograma em placa para o controle radioquímico, onde a concentração do extrato que melhor ofereceu uma resposta antioxidante foi a de 12,5%.

5.5 Comportamento biológico

Na avaliação deste aspecto foi realizada a técnica de biodistribuição, com o intuito de estudar qual o comportamento biológico do extrato de *Momordica charantia* L. em animais tratados agudamente e cronicamente. Há poucas informações na literatura estabelecendo modelos que estudem o efeito tóxico e/ou genotóxico de compostos químicos. E é possível estudar esses efeitos a partir de modificações ocorridas na captação de radionuclídeos e/ou radiofármacos induzidos pela presença de substâncias.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos no estudo de biodistribuição realizado de forma aguda, tratados por 2 horas, no grupo controle que só recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e no grupo experimental A que recebeu o extrato.

Tabela 1: Biodistribuição da *Momordica charantia L.* por 2 horas

Órgão	Controle A (%captação/g)	Tratado A (%captação/g)	
baço	1,0±0,1	0,1±0,04	
bexiga	5,3 ±0,3	1,1 ±0,7	
cérebro	0,2 ±0,01	0,1 ±0,01	
coração	1,7 ±0,2	0,01 ±0,003	
estômago	1,3 ±0,8	0,4 ±0,01	
fígado	6,4 ±0,6	1,9 ±0,9	*
Intestino delgado	2,5 ±0,6	0,6 ±0,4	
Intestino grosso	0,5 ±0,3	0,1 ±0,01	
músculo	1,0 ±0,7	0,2 ±0,1	
osso	0,9 ±0,4	0,1 ±0,02	
pâncreas	0,1 ±0,03	0,1 ±0,02	
pulmões	1,9 ±0,3	0,4 ±0,1	
rins	75,5 ±11,4	9,9 ±3,00	*
testículos	1,2 ±0,1	0,3 ±0,1	*
tireóide	0,4 ±0,01	0,1 ±0,002	

Resultados expressos em %captação /g de tecido ± DP

Os valores apresentados na Tabela 1 demonstram que houve redução no percentual de captação em praticamente todos os órgãos estudados, com exceção do pâncreas, contudo a redução apenas mostrou-se significativa no fígado, rins e testículos.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos no estudo de biodistribuição realizado de forma aguda, no grupo controle que só recebeu solução salina (NaCl 0,9%), permanecendo 4 horas incubado e do grupo experimental B que recebeu o extrato, permanecendo incubado nas mesmas condições do controle.

Tabela 2: Biodistribuição da *Momordica charantia L.* por 4 horas

Órgão	Controle B (%captação/g)	Tratado B (%captação/g)
baço	0,22 ± 0,1	0,05 ± 0,01
bexiga	6,20 ± 0,5	0,6 ± 0,02
cérebro	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,03
coração	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,09
estômago	1,0 ± 0,08	0,5 ± 0,10
fígado	3,5 ± 1,3	7,4 ± 3,2
Intestino delgado	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,3
Intestino grosso	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
músculo	0,01 ± 0,04	0,2 ± 0,1
osso	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01
pâncreas	0,07 ± 0,03	0,2 ± 0,07
pulmões	0,8 ± 0,05	1,0 ± 0,3
rins	19,4 ± 8,61	7,6 ± 1,7
testículos	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,04
tireóide	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01

Resultados expressos em %captação /g de tecido ± DP

Ao analisar os valores apresentados na Tabela 2, pode-se perceber uma redução no percentual de captação de alguns dos órgãos estudados, destacando-se novamente essa redução nos rins e testículos. Contudo em alguns órgãos esse comportamento não se repetiu, como é o caso do cérebro, fígado, intestino grosso, músculo, osso, pâncreas, pulmões e tireóide.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos após a biodistribuição no tratamento crônico, ou seja, administração do extrato da *Momordica charantia L.* por 10 dias consecutivos. O estudo foi realizado no 11^o dia e após um período de incubação de 30 minutos da administração via plexo ocular do pertecnetato reduzido.

Tabela 3: Biodistribuição da *Momordica charantia* L., estudo crônico, por 10 dias.

Órgão	Contr.(%captação/g)	Trat.30min(%captação/g)
Baço	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2
Bexiga	0,2 ± 0,05	1,3 ± 0,1
Cérebro	0,2 ± 0,04	0,3 ± 0,2
Coração	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,3
Estômago	0,3 ± 0,05	0,7 ± 0,2
Fígado	10,5 ± 1,6	7,6 ± 1,8
Intestino delgado	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Intestino grosso	0,4 ± 0,05	1,0 ± 0,2
Músculo	0,2 ± 0,06	0,2 ± 0,1
Osso	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Pâncreas	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3
Pulmões	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,4
Rins	48,1 ± 18,1	51,1 ± 11,3
Testículos	0,6 ± 0,07	0,3 ± 0,01
Tireóide	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,06

Resultados expressos em %captação /g de tecido ± DP

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento crônico dos animais com o extrato aquoso de *Momordica charantia* L. promoveu uma alteração no percentual de captação do radionuclídeo nos órgãos observados. É importante ressaltar a redução que houve no fígado e nos testículos.

O estudo do comportamento biológico de compostos químicos naturais ou sintéticos ainda precisa ser elucidado e a técnica de biodistribuição tem se mostrado uma importante ferramenta no esclarecimento desta questão. Como uma droga terapêutica atua no sistema biológico promovendo efeitos diretos e/ou indiretos, pode alterar a biodisponibilidade do radiofármaco. Segundo MATTOS *et. al.* (2001), a vincristina, composto usado em protocolos quimioterápicos na oncologia, derivada da planta Vinca rósea, quando associada ao ^{99m}Tc -GHA, ^{99m}Tc -DMSA e ^{99m}Tc -DTPA altera a biodisponibilidade deste radiofármaco devido sua ação metabólica, tóxica e imunossupressora. Ela promove um aumento

significativo da captação do radiofármaco ^{99m}Tc -DMSA no pulmão, pâncreas, coração, tireóide, cérebro, osso, linfonodos, útero, ovário, baço, timo, rins e fígado.

A técnica de biodistribuição também pode ser usada como meio para explicar o comportamento de fármacos no organismo diante de algumas alterações fisiológicas, tais como presença de parasitas. SIMÕES *et. al.*, (1997) explicaram o comportamento do anestésico fenobarbital, aplicando o ^{99m}Tc como traçador radioativo em camundongos infectados com o *Schistosoma mansoni*.

De acordo com BANERJEE *et. al.*, (2005) outra aplicação da biodistribuição é de avaliar a interferência que substâncias coloidais podem provocar no comportamento de nanopartículas nos diferentes tecidos orgânicos. Além disso, o mesmo grupo confirmou a eficiência do cloreto estanoico como agente redutor do radionuclídeo ^{99m}Tc , em relação ao hidrato-sódico de boro.

A hiperglicemia presente em animais diabéticos é capaz de proporcionar um “stress” oxidativo no organismo (RAZA *et. al.*, 2000; RAZA *et. al.*, 2002). Esse fato promove alterações fisiopatológicas que podem ser corrigidas por enzimas antioxidantes, capazes de desintoxicar os tecidos. O extrato aquoso do fruto da *Momordica charantia* L., mostrou-se capaz de regular a expressão tecidual da enzima antioxidante Glutathione-S-Transferase (GST). Essa enzima defende as células de uma variedade de insumos tóxicos advindos de compostos químicos, de metabólitos e das alterações fisiológicas do “stress” oxidativo (RAZA *et. al.*, 2004).

De acordo com RAZA *et. al.*, (2004) as isoenzimas alfa, mu e pi da GST se distribuem preferencialmente no fígado, rins e testículos em ratos diabéticos tratados com streptozotocin (STZ). Além disso, ao utilizar a técnica de imunohistoquímica, foi determinada a expressão tecidual das isoenzimas da GST em tecidos de ratos normais.

Alguns vegetais e frutos apresentam naturalmente fatores indutores e/ou inibidores da GST (HAYES & PULLOFORD, 1995). Esta enzima atua sobre as espécies reativas de oxigênio, como os superperóxidos e sobre produtos capazes de gerar peroxidação lipídica nas membranas. O alvo deste trabalho foi o extrato aquoso das folhas da *Momordica charantia* L. (MC), aplicando o mesmo de forma aguda e crônica em ratos Wistar. As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os valores

obtidos, conforme descrição anterior, a discussão desses valores pode estar relacionada à localização tecidual das isoenzimas da GST.

A GST apresenta três isoformas, a alfa, a mu e a pi. O estudo da expressão tecidual dessas isoformas, conforme RAZA *et. al.*, (2002) e RAZA *et. al.*, (2004) em ratos normais, amostra semelhante a deste trabalho, mostrou que a isoenzima alfa apresentou-se no fígado, com distribuição heterogênea. O mesmo comportamento ocorreu com a GST mu, contudo a pi não se expressou no fígado. Dessa forma, podemos observar que o percentual de captação do radionuclídeo no fígado reduziu no grupo experimental A e no tratamento crônico. Esse resultado está coerente com a expressão da GST neste tecido que ao agir como antioxidante promove menor captação do radionuclídeo.

Nos rins houve uma moderada expressão da GST alfa, da mesma forma com as isoformas mu e pi, segundo RAZA *et. al.*, (2002) e RAZA *et. al.*, (2004). Em nossos resultados a captação do radionuclídeo nos rins na presença do extrato de MC reduziu nos grupos experimentais A e B. Essa resposta foi intensa no grupo A, fato explicado pelo potencial hipoglicemiante do extrato ser mais expressiva no grupo experimental A do que no B, segundo nossos resultados da avaliação metabólica. Além disso, esse comportamento também pode ser explicado pela expressão tecidual das isoformas da enzima GST nos rins.

Nos testículos, as três isoenzimas se expressam em ratos normais conforme RAZA *et. al.*, (2002) e RAZA *et. al.*, (2004). Essa homogeneidade de expressão enzimática pode explicar a redução do percentual de captação do radionuclídeo nesse órgão, nos grupos experimentais A e B e no estudo crônico.

Essa diferente expressão das isoformas da enzima GST nos tecidos citados pode servir como marcador de dano celular em diabéticos, já a participação do fígado e rins está relacionada com o papel de desintoxicação desses órgãos. Além disso, o extrato da *Momordica charantia L.* estimula a secreção de insulina, como foi discutido anteriormente, o que pode estar influenciando a modulação das isoenzimas de GST (RAZA *et. al.*, 2004).

5.6 Efeito radioprotetor: considerações

O mecanismo de ação dos radioprotetores pode ocorrer através do bloqueio na formação dos radicais livres, que são compostos de alta reatividade e geradores de danos celulares. Assim, neste trabalho, houve a busca do efeito radioprotetor do extrato aquoso da *Momordica charantia L.* através de alterações metabólicas e hormonais (WEISS & LANDAUER, 2003; JAGETIA *et. al.*, 2003) BLOCK, 2004; DOLABELA *et. al.*, 1998, JAGETIA & BALIGA, 2002).

Os radicais livres não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos. As espécies radicalares participam tanto das reações inflamatórias, como também dos mecanismos de transdução de sinais, atuando como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Portanto, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares, deve ser finamente regulado de modo que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (LARINI, 1997; BLOCK, 2004).

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelo metabolismo são mantidas em baixas concentrações intracelulares pela ação da enzima superóxido desmutase (SOD), e pela família enzimática da glutathione, dentre elas a glutathione peroxidase (GPx), a transferase e a catalase. A SOD está distribuída em alguns órgãos tais como: o fígado, cérebro, testículos, rins, coração, estômago, pulmão e pâncreas. No tecido sanguíneo, em particular, a SOD tem uma afinidade maior pelas hemácias do que com as plaquetas e com o plasma. A glutathione peroxidase cataliza a redução de hidroxiperoxídeos orgânicos e inorgânicos pela glutathione reduzida (GSH). Sua atividade varia em diversos órgãos, sendo a afinidade maior no fígado, rins, pâncreas, cérebro, coração, pulmão, baço e músculos esqueléticos. A catalase está localizada nos peroxissomos do fígado, rins e em microperoxissomos de outras células (LARINI, 1997).

Os fluidos extracelulares, tais como o plasma sanguíneo e o fluido cefalorraquidiano contêm baixas atividades de catalase, SOD e glutathione

peroxidase, assim possuem menor atividade antioxidante (LARINI, 1997; DOLABELA *et. al.*, 1998, JAGETIA & BALIGA, 2002).

A determinação do efeito radioprotetor de compostos químicos de origem natural ou sintética tem sido realizada pela mensuração das enzimas que apresentam propriedades antioxidantes. No entanto, como as mesmas apresentam papéis fisiológicos, é possível avaliar numa amplitude maior, através de parâmetros metabólicos e fisiopatológicos, possíveis efeitos radioprotetor de compostos químicos, assim como foi realizado neste trabalho. Esse subtópico tem o intuito de mostrar que os parâmetros avaliados ao longo deste capítulo podem oferecer subsídios para mensurar a capacidade radioprotetora do extrato aquoso de folhas da *Momordica charantia L.* sem necessariamente quantificar as enzimas antioxidantes citadas e que, além disso, permitem uma avaliação mais ampla de seus efeitos.

Neste contexto, o extrato aquoso da *Momordica charantia L.*, nas concentrações estudadas pode ser utilizado como radioprotetor, e permite extrapolar suas aplicações em diversas atividades de interesse humano, como uso em pacientes de radioterapia, uso como coadjuvante antioxidante em cosméticos, tais como protetores solares e uso como hipoglicemiante e antiinflamatório. Dessa forma, este trabalho traz contribuições a população e merece ser levado a diante para estabelecer novas aplicações deste extrato, bem como promover a síntese do mesmo em maior escala.

6 CONCLUSÕES

O estudo do extrato das folhas de *Momordica charantia* L. nos revela que o mesmo apresenta as seguintes propriedades:

- Moléculas de comportamento protéico, segundo o cromatograma realizado;
- É passível de marcação adequada com o ^{99m}Tc , diante dos testes de controle de qualidade, com propriedades redutoras;
- Um efeito farmacológico acentuado causando a elevação de insulina sérica, reduzindo a concentração de glicose sérica, com provável atuação sobre as células β pancreáticas;
- Atividade antiinflamatória quando aplicado ao modelo de edema de pata induzido por carragininina, com redução nos níveis de cortisol sérico;
- Não é capaz de promover fragilidade celular, resultado este confirmado pelo teste de marcação de hemácias e proteínas plasmáticas e estudo morfológico das hemácias, mostrando-se como um possível agente redutor;

Os dados acima mencionados permitem a afirmação que o extrato aquoso de folhas da *Momordica charantia* é capaz de alterar o comportamento biológico do ^{99m}Tc nos tecidos, caracterizando seu provável efeito radioprotetor.

6.1 Perspectivas

As informações adquiridas durante a realização deste trabalho e no cotidiano acadêmico, permitem a proposição de outras pesquisas, num futuro próximo, para caracterizar compostos de origem natural e sintética quanto o seu aspecto radiomodificador. Pretende-se ainda, durante o desenvolvimento dos novos experimentos, utilizar o cálculo do fator de redução de dose, técnicas biofísicas e de dosimetria biológica. O intuito é dar continuidade às atividades que envolvam ciência e biotecnologia, de maneira a estimular a pesquisa e proporcionar o conhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. E. Redox, radiation and reductive dioactivation. **Radiat Res**, 132:129-139, 1992.
- AHMAD, N.; HASSAN, M. R.; HALDER, H.; BENNOOR K. S. Effect of *Momordica charantia* (karella) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. **Bangladesh Medical Research Council Bulletin**, v.25, n.1, p.11-13, April, 1999.
- AHMED, I.; LAKANI, M.S.; GILLETT, M.; JOHN, A; RAZA, H. Hypotriglyceridemic and hypocholesteromic effects of anti-diabetic *Momordica charatia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.51, n.3, p.155-161, March, 2001.
- AHMED, I.; AEGHATE, E.; SHARMA, A. K.; PALLOT, D. J.; SINGH, J. Effects of *Momordica charatia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.40, n.3, p.145-151, June, 1998
- ALAOUI-YOUSSEFI, A.; LAMPROGLOU, I.; DRIEU, K.; EMERIT, I. Anticlastogenic effects of *Gingko biloba* extract (EGb 761) and some of its constituents in irradiated rats. **Mutat. Res.** v. 445, p. 99-104, 1999.
- ARANO, Y. Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 16, n. 2, p. 79-93, 2002.
- BANERJEE, T.; SINGH, A.K.; SHARMA, R.K.; MAITRA, A.N. Labeling efficiency and biodistribution of technetium-99m labeled nanoparticles: interference by colloidal oxide particles. **International Journal of Pharmaceutics** 289: 189-195, 2005.
- BASH, E; GABARDI, S; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy an safety. **American Journal Health System Pharmacy**, v.60,n.4, p.356-359, February, 2003.
- BAUER, R. & PABT, H. Tc-gerators yield o ^{99m}Tc and ratio to inactive ^{99}Tc . **J. Nucl. Med.** 7: 35-6. 1982.
- BELOIN, N.; GBASSOR, M.; AKPAGANA, K.; HUDSON,J.; SOUSSA, K.de; KOUMAGLO, K.; ARNASSON, J.T.2005. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and Relacion to its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology.** v.96. pp.49-55.
- BERNARDO-FILHO, M.; SILVA, J.R.M.; REIS, R.J.N.; BOASQUEVISQUE, E.M. Conditions for labelling of *Schistosoma mansoni* cercariae with technetium-99m. **Journal of Nuclear biology and Medicine**, 36:56-59, 1992b.

BERNARDO-FILHO, M.; NOGUEIRA, J.F.; STURM, J.A.; BOASQUEVISQUE, E.M. Plasma proteins labeling with ^{99m}Tc . **Arq. Biol. Technol.**, 33:811-817, 1990.

BERNARDO-FILHO, M.; BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; FELICIANO, G.D.; REINIGER, I.W.; OLIVEIRA, J.S.; SILVA, C.R.. The effect of drugs on the labeling of blood elements with technetium-99m. **Current Pharmaceutical Design**, v.6, p.1179-1191, 2000. (a)

BERNARDO-FILHO, M.; de OLIVEIRA, J.S.; BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; AVILA, A.S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; CARDOSO, V.N.; BEZERRA, R.J.. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n.1-2, p.179-184, 2000. (b)

BERNARDO-FILHO, M.; ÁVILA, A.S.R.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; MOTTA, A.C.; ARAÚJO, A.C.; MATTOS, B.M. Biological effect of a reducing agent used to prepare technetium-99m radiopharmaceuticals in red blood cells: Evaluation of osmotic fragility. **Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds**. v.7.,2001.

BERNARDO-FILHO, M.; MOURA, I. N. S. AND BOASQUEVISQUE, E. M. Technetium-99m labeled red blood cells "in vitro". **Arq Biol Technol** 26, pp 455-461,1983.

BERNARDO-FILHO, M.; Gutflen, B. and Maciel, O. S. Effect of different anticoagulants on the labelling of red blood cells and plasma proteins with Tc-99m. **Nucl. Med. Comm** 15, pp.730-734, 1994.

BERNARDO-FILHO, M.; SANTOS-FILHO, S.D.; MOURA, E.G.; MAIWORM, A.I.; ORLANDO, M.M.C.; PENAS, M.E.; CARDOSO, V.N.; BERNARDO, L.C.; BRITO, L.C. Drog interaction with radiopharmaceuticals: a review. **Braz. Arch. of Biol. And Tech.** 48:13-27, 2005.

BLOCK, M.D. Antioxidants and cancer therapy:furthering the debate. **Interactive Cancer Therapies**. 3(4): 342-48, 2004.

BONNYMAN, J. Effect of milking efficiency on ^{99}Tc content of ^{99m}Tc derived from ^{99m}Tc generators. **J. Appl. Radiat. Isot.** v.34, n.6, p. 901-906, 1983.

BOURINBAIAR, A.S.; LEE-HUANG, S.1995. Potention of anti-hiv of anti-inflammatory drugs, dexamethasone and indomethacin, by MAP 30, the antiviral agent bitter melon. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.208, n.2. pp.479-85.

BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; FELICIANO, G.D.; REINIGER, I.W.; OLIVEIRA, J.F.; SILVA, C.R. and BERNARDO-FILHO, M. (2000),The effect of drugs on the labeling of blood elements with ^{99m}Tc . **Curr. Pharm. Design**, v.6, p.1179-1191.

BRITO, D.M.; GOMES, M.L.; RODRIGUES, P.C.; PAULA, E.F.; GUTFILEN, B. AND BERNARDO-FILHO, M. Effect of a chemotherapeutic drug on the biodistribution of ^{99m}Tc -DTPA in BALB/c mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 17, 3, 1998.

BROWN, D.. Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. **The Journal of the American Botanical Council and the Herb Research Foundation**, n.34, p.1513-1515, 1995.

BRODSKY, A.; KATHREN, R.L.; WILLIS, C.A. History of the medical uses of radiation regulatory and voluntary standards of protection. **Health Phys.**, v.69, n.5, p.783 – 823, 1995.

CAMERON, J.R.; SKOFRONICK, J.G. Medical physics. Singapore: John Wiley & Sons, 1978. p. 478 – 519.

CHAO CY, HUANG CJ. Bitter gourd (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. **J Biomed Sci.** 10(6 Pt 2):782-91, Nov-Dec, 2003.

CUNNICK JE, SAKAMOTO K, CHAPES SK, FORTNER GW, TAKEMOTO DJ. Induction of tumor cytotoxic immune cells using a protein from the bitter melon (*Momordica charantia*). **Cell Immunol.** v.126, n.2, p.278-89, April, 1990.

DAS, A.V.; PADAYATTI, P.S.; PAULOSE, C.S. Effect of leaf extract of *Aegle marmelose* (L.) Correa ex Roxb. on histological and ultra-structural changes in tissues of streptozotocin induced diabetic rats. **Indian J. Exp. Biol.** v.34, p. 341-345, 1996.

DAY, C.; CARTWRIGHT, T.; PROVOST, J.; BAILEY C. J. Hypoglycemic effect of *Momordica charantia* extracts. **Planta Medica**,v.56,n.5,p.426-429, October, 1990.

DOLABELA, M.F.; PEREIRA, M.T.; SALAS, C.E.; STEFFANI, G.M.; NELSON, D.L.; PILO-VELOSO, D.; LOPES, M.T.P. The radioprotective effect of a new aminothiols (20-PRA). **Brazilian Journal of Medical Biological Research.** 31:1095-98, 1998.

DONGMO, A.B.; NGUELEFACK,T.; LAICALLE-DUBOIS, M.A. 2005. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acácia pennata* wild (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, pp.201-206.

EARLY, P.J.; LANDA, E.R. Use of therapeutic radionuclides in medicine. **Health Phys.**, v. 69, n.5, p.677 – 694, 1995.

EARLY, P.J.; SODEE, B.D. Principles and practice of nuclear medicine. 2ed **Mosby Year Book**, Inc, London, 1995.

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisas agropecuária. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/plantasmed.html>. Acessado em: 23/07/2004, 14:40 h.

FARREL, N. Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents, cap. 8, Klumer Academic, 1989.

GROVER, J.K.; YADAV, S; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, n.1, p. 81-100, June, 2002.

GROVER JK, YADAV S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **J. Ethnopharmacol.** 2004 Jul;93(1):123-32.

HALL, E.J. Radiobiology for the radiologist. J.b. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.

HAYES, J.D. & PULLTORD, D.J. The glutathione S-transferase superfamily regulation of GST and the contribution of the isoenzyme to cancer chemoprotection and drug resistance. **CRC Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 30: 445-600, 1995.

HOLLAND, M.E.; DEUTSCH, E.; HEINEMAN, W.R. Studies on commercially available $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ radionuclide generators-II. Operating characteristics and behavior of $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generators. **Appl. Radiat. Isot.** v.37, n.2, p.173-180, 1986.

HOSPERS, G.A.P., EISENHAUER, E.A. & VRIES, E.G.E. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. **British Journal of Cancer**, v.80, p. 629-638, 1999.

HARBERT JL, ECKELMAN WC & NEWMAN RD. Nuclear Medicine Diagnosis and Therapy New York. **Thieme Medical Publishers**,1996.

HUSAK, V.; VLCEK, J. Some remarks on $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator kinetics. **J. Nucl. Med.** v.7, p. 331-332, 1982.

ICLAS – International Council for Laboratory Animal Science . Disponível em: <http://www.iclas.org/Documents.htm> Acessado em: 13/07/2007, 15:30 h.

ICE, R.D. History of medical radionuclide production. **Health Phys.**, v.69, n.5, p. 721-727, 1995.

IKEDA,I.; INOUE, O.; KURATA, K. A new preparation method for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ phytate. **Journal of Nuclear Medicine.** 17(5): 389-93. 1976.

JAFRI, M.A.; ASLAM, M.; JAVED, K.; SINGH, S.. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.309-314, 2000.

JAGETIA, G.C.; BALIGA, M.S. Influence of the leaf extract of *Mentha arvensis* Linn. (mint) on the survival of mice exposed to different doses of gamma radiation. **Strahlenther Onkol.** v. 178, p. 91-98, 2002.

JAGETIA, G.C.; VENKATESH, P.; BALIGA, M.S. Fruit extract of *Aegle marmelos* protects mice against radiation-induced lethality. **Integrative Cancer Therapies.** v. 3(4), p. 323-332, 2004.

JAGETIA, G.C.; BALIGA, M.S.; VENKATESH, P.; ULLOOR, J.N. Influence of *Ginger rhizome (zingiber officinale* Rosc.) on survival, glutathione and lipid peroxidation in mice after whole-body exposure to gamma radiation. **Radiat. Res.** v. 160, p. 5845-5892, 2003.

JIRATCHARIYAKUL W, WIWAT C, VONGSAKUL M, SOMANABANDHU A, LEELAMANIT W, FUJII I, SUWANNAROJ N, EBIZUKA Y. HIV inhibitor from Thai bitter gourd. **Planta Med.** v.67, n.4, p.350-3, June, 2001.

KAMALAKKANNAN, N.; STANELY MAIZEN PRINCE P. Effect of *Aegle marmelos* Correa. (fruit) extract on tissue antioxidants in streptozotocin diabetic rats. **Indian J. Exp. Biol.** v.41, p. 1285-1288, 2003.

KAR, A.; CHOUDHARY, B.K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology.** 84: 105-108. 2003.

KOHNO H, YASUI Y, SUZUKI R, HOSOKAWA M, MIYASHITA K, TANAKA T. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPAR γ expression and alteration of lipid composition. **Int J Cancer.** 2004 Jul 20;110(6):896-901.

LARINI, L. Toxicologia. Terceira edição, Editora Manole, 1997 301p.

LEE-HUANG, S.; HUANG, P.L.; CHEN, H.C.; HUANG, L.P.; BOURINBAIAR, A; HUANG, H.I.; KUNG, H.F. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP 30 from bitter melon. **Gene,** v.161, n.2, p.151-156, August, 1995.

LEE-HUANG S, HUANG P.L., SUN Y, CHEN HC, KUNG HF, HUANG PL, MURPHY WJ. Inhibition of MDA-MB-231 human breast tumor xenografts and HER2 expression by anti-tumor agents GAP31 and MAP30. **Anticancer Res.** v. 20,n.2A,p.653-9,Mar-Apr,1994.

LEVY, L.. Carragenan paw edema in the mouse. **Life Sci.,** v.8, p.601-605, 1969.

LYUBIMOVA, N.V.; COULTAS, P.G.; YUEN, K.; MARTIN, R.F. In vivo radioprotection of mouse brain endothelial cells by Hoechst 33342. **The British Journal of Radiology.** V.74 p. 77-82, 2001.

MANZI, F.R.; BOSCOLO, F.N.; ALMEIDA, S.M.; TUJI, F.M. Estudo morfológico do efeito radioprotetor da vit.E (DL-Alfa tocoferil) na reparação tecidual em ratos. **Radiol. Bras.** v.36(6) p.367- 371, 2003.

MANABE M.; TAKENAKA R.; NAKASA T.; OKINAKA O. Induction of anti-inflammatory responses by dietary *Momordica charantia* L. (Bitter Gourd). **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67 (12), 2512-17, 2003.

MARTIN, R.F.; BROADHURST, S.; REUM, M.E.; SQUIRE, C.J. In vitro studies with methylproamine: A potent new radioprotector. **Cancer research.** v.61 p.1067-1070, 2001.

MATTOS, D.M.M.; GOMES, M.L.; FREITAS, R.S.; RODRIGUES, P.C.; NASCIMENTO, V.D.; BOASQUEVISQUE, E.M.; PAULA, E.F.; BERNARDO FILHO, M. Model to evaluate the biological effect of natural products: vincristine action on the biodistribution of radiopharmaceuticals in BALB/c female mice. **Journal of Applied Toxicology**, 19, 000-000, 1999.

MCCARTY, M.F. Does bitter melon contain an activator of amp-activated kinase? **Medical Hypotheses** 63: 340-43. 2004.

MIURA T.; ITOH Y.; IWAMOTO N.; KATO M.; ISHIDA T. Suppressive Activity of the Fruti of *Momordica charantia* with Exercise on Blood Glucose in Type 2 Diabetic Mice. **Biol. Pharm. Bull.** 27(2)248-250, 2004.

MIURA, T.; ITOH C., IWAMOTO N.; KATO, M.; KAWAI, M.; PARK, S. R.; SUZUKI I. Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charatia* in type 2 diabetic mice. **Journal of Nutritional Science & Vitaminology**, v.47, n.5, p.350-354, October, 2001.

MORENO S, ROCHA EK, PEREIRA M. MANDARIM-LACERDA C, FREITAS RS, NASCIMENTO ALR, CARVALHO JJ, LIMA-FILHO G, DIRÉ G, LIMA E & BERNARDO-FILHO M. *Ginkgo biloba*: experimental model to evaluate its action on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the morphometry of red blood cells. **Pakistan Journal of Nutrition**, 3:68-71, 2004

MOUHAJIR, F.; HUDSON, J.B.; REJDALI, M.; TOWERS, G.H.N.. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber peoples of Morocco. **Pharmaceutical Biology**, v.39, n.5, p.364-374, 2001.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L.. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NIMRI, L.F.; MEQDAM, M.M.; ALKOFAHI, A.. Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, v.37, n.3, p.196-201, 1999.

OLIVEIRA, R. B. & ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**. V.25(6) p.976-984, 2002.

OLIVEIRA, J. F.; AVILA, A S.; BRAGA, M. B. N. DE OLIVEIRA; BOASQUEVISQUE, E. M.; JALE, R. L.; CARDOSO, V. N.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of extract of medicinal plants on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the morphology of red blood cells :l-a study with *Paulinia cupana* .**Fitoterapia** v73, pp.305-312, 2002.

OLIVEIRA, J.F.; SANTOS-FILHO, S.D.; CATANHO, M. T. S. A.; SRIVASTAVA, S.C.; LIMA-FILHO, G.L. AND BERNARDO-FILHO, M. Effect of extract of medicinal plants on the labelling of blood elements with Technetium-99m and on the morphology of red blood cells (RBC): Toxicological Actions of *Roast Coffee beans (Coffea Arabica)*. **Indian Jour of Nuc Med**, 18, 52-56, 2003.

OLIVEIRA, J.F.; BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; ÁVILA, A.S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; CARDOSO, V.N.; BEZERRA, R.J.A.C. AND BERNARDO-FILHO, M. (2000), Assessment of the Effect of *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa) extract on the Labeling of Red Blood Cells and Plasma proteins with Technetium-99m. **Jour of Ethno**, 72, 179-184, 2000.

OU L, KONG LY, ZHANG XM, NIWA M. Oxidation of ferulic acid by *Momordica charantia* peroxidase and related anti-inflammation activity changes. **Biol Pharm Bull**, v.26, n.11, p. 1511-6, November,2003.

PARI, L; RAMAKRISHNAN R; VENKATESWARAN S. Anttihyperglycemic effect of Diamed, a herbal formulation, in experimental diabetes in rats. **J. Pharm Pharmacol**, v.53, n.8, p.1139-1143, August, 2001.

PINKNEY, J. Dee; HERRON, Lorri. Effect of bitter melon (*Momordica charantia Linn*) on level and function of natural killer cells in cervical câncer patients with radiotherapy. **J. Med. Assoc. Thai**. 86(1): 61-8. 1996.

PONGNIKORN S, FONGMOON D, KASINRERK W, LIMTRAKUL PN. Effect of bitter melon (*Momordica charantia Linn*) on level and function of natural killer cells in cervical cancer patients with radiotherapy. **J Med Assoc Thai**. 86(1): 61-8. Jan, 2003.

RATHI, S.S; GROVER, J.K; VATS, V. The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes na their effect on key metabolic enzymes involved in carbohyrate metabolism. **Phytotherapy Research**, v.16, n.3, p.236-243, May, 2002.

RAZA, H.; AHMED, I.; JOHN, A.; SHARMA, A.K. Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. **Jounal of Biochemical and Molecular Toxicology** 14: 131-139, 2000.

RAZA, H.; AHMED, I.; JOHN, A. Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S-transferase in streptozotocin induced diabetic rats: modulation by *Momordica charantia* (karela) extract. **Life Sci.** 6;74(12):1503-11, February,2004.

RAZA, H.; ROBIN, M.A.; FANG, J.K.; AVADHANI, N.G. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione-S-transferases and their differential induction under oxidative stress. **Biochemical Journal** 366:45-55, 2002.

REINIGER, I.W.; OLIVEIRA, J.F.; CALDEIRA, A.A. de; BERNARDO-FILHO, M. Effect of *Peumus boldus* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **Applied Radiation and Isotopes**, 51: 145-149, 1999.

RIPOLL-HAMER, E.; FREITAS, L.C.; PAULA, E.F.; FONSECA, L.M.; GUTFILEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. In vitro effect of cyclophosphamide on the binding of radiopharmaceuticals ($^{99m}\text{TcO}_4$ and TcMDP) to blood elements. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31:185-195, 1998.

RODHES, B.A.; CROFT, B.Y. **Basics of radiopharmacy**. Saint Louis: C. V. Mosby Company, p.1-14, 52-61, 117-121, 123-130, 1978.

ROOK, G.A.W. 1995. Glucocorticoids and immune function. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.13. n.4. pp. 567-81.

SANTINI, G.; PATRIGNANI, P.; SCIULLI, M.G.; SETA, F.; TACCONELLI, S.; PANARA, M.R.; RICCIOTTI, E.; CAPONE, M.L.; PATRONO, C. 2001. The human pharmacology of monocyte cyclooxygenase 2 inhibitor by cortisol and synthetic glucocorticoids. **Clinical Pharmacology & therapeutics**. pp.475-83.

SANTOS, J. S.; PAULA, E.F.; CORREA, T.G.; FREITAS, L.C.; FONSECA, L.M.; GUTFILEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of cyclophosphamide on the binding of $^{99m}\text{TcO}_4$ and $^{99m}\text{Tc-MDP}$ to blood cells and plasma proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 28: 131-135, 1995.

SAHA, G. B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 3rd New York: **Springer-Verlag**, 1998.

SARKAR, S; PRANAVA, M; MARITA, R. Demonstration of the hypoglycemic action of *Momordica charantia* in validated animal model of diabetes. **Pharmacological Research**, v.33, n.1, p.1-4, January, 1996.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.23-43, July, 2000.

SENANAYAKE GV, MARUYAMA M, SHIBUYA K, SAKONO M, FUKUDA N, MORISHITA T, YUKIZAKI C, KAWANO M, OHTA H. The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. **J Ethnopharmacol.** 91(2-3):257-62, April, 2004.

SIMÕES, S.B.E.; MACHADO-SILVA, J.R.; GUTFILEN, B.; PRESGRAVE, O.A.F.; OLIVEIRA, M. B.; BERNARDO-FILHO, M. Biodistribution study of the anaesthetic sodium phenobarbital labelled with technetium-99m in swiss mice infected with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 92(5):677-681, Sep./oct. 1997.

SHOBA, F.G.; THOMAS, M. Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor-oil induced diarrhoea. **J. Ethnopharmacol.** v.76, p. 73-76, 2001.

SITASAWAD, S. L.; SHEWADE, Y.; BHONDE R. Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic in vivo and in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1-2, p.71-79, November, 2000.

SOEJARTO, D.D.. Biodiversity, prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p. 1-15, 1996.

SOUZA, G.M.L.. Estudo dos Efeitos Biológicos do *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) "in vivo" e "in vitro". **Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**, CCS, UFPE, 2001.

SRIVASTAVA, S. State of the art (and science) of blood cell labeling. **Brookhaven Lecture Series.** 232,pp.1-14,1987.

TUBIS, M; WOLF, W. **Radiopharmacy.** New York: Jonh Wiley & Sons, p.3-6, 263-268, 1976.

UMA DEVI, P.; GANASOUDARI, A. Radioprotective effect of leaf extract on indian medicinal plant. *Ocimum sanctum*. **Indian J. Exp. Biol.** v. 33, p. 205-209, 1995.

URTASUN, R.C.; CHAPMAN, J. D.; RALEIGH, J.A.; FRANKO, A.J.; KOCH, C.J. Binding of ³H-misonidazole to solid human tumors as a measure of tumor hypoxia. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** V.12, p. 1263-1267, 1986.

VIRDI J, SIVAKAMI S, SHAHANI S, SUTHAR AC, BANAVALLIKAR MM, BIYANI MK. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **J Ethnopharmacol.** 88(1):107-11, Sep, 2003.

ZEMA, E.M.; HIRST, V.K.; LEMMON, M.J.; BROWN, J. M. Enhancement of radiation induced tumour cell killing by hypotoxic cell toxin sr 4233. **Radiother Oncol** 12:209-218, 1988.

ZENG YT, BEN KL, JIN SW. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes. **Zhongguo Yao Li Xue Bao.** v.20,n.3,p.239-43, March, 1999.

YEH, G.Y.; EISEBERG, D. M.; KAPTCHUK, T.J.; PHILLIPS, R. S. Systematic review of herbs and dietary supplements for control diabetes. **Diabetes Care**, v.26, n.4, p.1277-1294, April, 2003.

WELIHINDA, J.; ARVIDSON, G.; GYLFE, E.; HELLMAN, B.; KARLSSON, E. The insulin-releasing activity of the tropical plant *Momordica charantia*. **Acta Biol. Med. Ger.** 41(12):1229-40. 1982.

WEISS, J.F.; LANDAUER, M.R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. **Toxicology**. 189: 1-20, 2003.