

Fernanda Rocha Soares

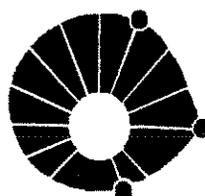
**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *Curatella americana* SOBRE A MARCAÇÃO DE
ELEMENTOS SANGÜÍNEOS COM TECNÉCIO 99M E NA
SOBREVIVÊNCIA DE CULTURA BACTERIANA.**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestra
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médica
UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia
Farmacêutica – Fernanda Rocha Soares.*

Campinas, 05 de novembro de 2003.

Alba Regina Monteiro Souza Brito
- Orientadora -

Campinas, 2003



UNICAMP

Faculdade de Ciências Médicas

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLE**

Fernanda Rocha Soares

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *Curatella americana* SOBRE A MARCAÇÃO DE
ELEMENTOS SANGÜÍNEOS COM TECNÍCIO 99M E NA
SOBREVIVÊNCIA DE CULTURA BACTERIANA.**

*Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas 2003

UNIDADE	FC
1ª CHAMADA	I UNICAMP
	Solla
	EX
OMBO BC/	60614
ROC	6. 117.04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	11-22-04
1ª CPD	

bid 329830

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Solla Soares, Fernanda Rocha
 Avaliação dos efeitos do extrato etanólico de *Curatella americana* sobre a marcação de elementos sanguíneos com ^{99m}Tc e na sobrevivência de cultura bacteriana / Fernanda Rocha Soares. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medicina nuclear. 2. Plantas medicinais. 3. Radioisótopos em Biologia. 4. *Escherichia coli*. I. Alba Regina Monteiro Souza Brito. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Prof. Dr. Mário Bernardo Filho

Prof^a. Dr^a. Fernanda Ramos Gadelha

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/11/2003

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família que me ajudou, amparou, secou minhas lágrimas e soube rir comigo. Obrigado minha mãe, meu pai, minha avó e madrinha e meus irmãos. Amo muito vocês.

Epígrafe

O saber é uma coisa sagrada, o deus dos deuses, e infunde o respeito em cabeças coroadas: um homem despojado de saber é apenas um animal. Os valores e a mobília de uma casa podem ser roubados por ladrões, mas o saber, o maior tesouro, está acima de todo roubo.

Os Puranas , II

Agradecimentos

“A DEUS, OBRIGADA POR TUDO QUE O SENHOR ME CONCEDEU NESTA VIDA”

A epígrafe do início representa minha filosofia de vida. Mas, além disso, representa uma sincera e saudosa homenagem aos meus avós paterno Ângelo Soares e materno José Emílio Rocha que sempre incentivaram o saber, cada um à sua maneira, dizendo que “o saber não ocupa espaço”.

À minha avó Assumpta Gonçalves Rocha pelo apoio incondicional e pelos créditos que me concedeu. Sem você, talvez, eu nunca poderia estar onde estou. À minha avó paterna Gertrudes Soares que, ao seu modo, sempre esteve comigo, me protegendo e me guiando. Obrigada “Vó”.

Aos meus pais Nair e Luís Leopoldo, que às custas de muitos sacrifícios, estão conseguindo formar todos os seus filhos. Mãe, sei como cada conquista minha é sua também. Com cada degrau que alcanço espero poder retribuir o dom da vida que você me permitiu ter. Pai, lhe agradeço cada dia por estar comigo e este trabalho é também fruto do seu esforço e dedicação incondicional. Amo vocês.

Ao meu irmão Leopoldo que me ajudou a entender que brincar com a vida é necessário para poder arcar com a responsabilidade de estar vivo. Ao meu irmão Marcelo que é a luz da minha vida. Você, meu filho, é um ser iluminado que veio para ensinar nossa família a amar incondicionalmente, se respeitar e abrir mão de preconceitos.

À minha tia Gersulina e meu tio Zico, que me ampararam e deram abrigo quando

cheguei em Campinas. As minhas primas Claudete e Vânia pelas conversas e conselhos e, especialmente, à minha prima Maria Lúcia (Marilu) que me guiou e me ensinou a ser uma verdadeira pesquisadora.

Aos meus professores de faculdade Rogério Cardoso (Rogerinho) e João Carloni Filho pelo incentivo e confiança que sempre depositaram em mim. Por terem me aberto os olhos para o mundo da pesquisa e serem mentores desta minha vontade de ser cientista.

Ao meu amigo e companheiro Wilian que soube ter paciência durante meus momentos difíceis. Você foi e continua sendo muito importante para mim. Nunca deixe de sonhar. Te adoro muito.

Aos meus amigos do coral, em particular Paulo Rowlands e Fabiana Rowlands. Você, Paulo, me mostrou o que pode ser uma verdadeira amizade. Obrigada amigo, te adoro.

À minha orientadora Alba pela sua paciência, orientação e exemplo profissional. Obrigada por tudo.

Ao meu “tutor” no Rio de Janeiro Mário Bernardo Filho. Seu carinho, dedicação, cooperação e paciência sem dúvida foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Fernanda Gadelha que me acompanhou e me ajudou desde a qualificação com sua ternura e paciência.

Aos amigos que fiz no Rio de Janeiro, especialmente, a Marcinha, ao Gláucio, a

Scheila e à Cláudia. Vocês foram e são pessoas muito especiais para mim.

Aos docentes do Instituto de Biologia pela acolhida e auxílio profissional. Aos amigos que fiz e “desfiz” neste Instituto, a amizade de vocês me ajudou a compreender a vida de uma maneira diferente. Aos colegas de laboratório pela experiência e companheirismo que me ensinaram.

À Prof^a Dr^a Clélia Akiko Hiruma Lima pelo fornecimento da planta com a qual foi possível realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e seus alunos, em especial Fábio, pela colaboração na extração e purificação dos extratos.

Aos funcionários Zefa, Alexandra, Lú, e Ivo do Instituto de Biologia e Wanderley do Departamento de Farmacologia pela ajuda nos momentos de necessidades.

Às minhas amigas Paola, Luana e Adriana pelo apoio, noites de conversa e conselhos.

Aos animais que involuntariamente doaram suas vidas para o benefício da humanidade, o meu profundo respeito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 00/08095-0) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	xi
Lista de ilustrações.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. Introdução	
1.1 Considerações gerais.....	17
1.2 Tecnécio-99m.....	19
1.3 Agente redutor.....	22
1.4 Sangue.....	23
1.4.1 Constituintes plasmáticos.....	23
1.4.2 Estrutura das hemácias.....	24
1.5 Modelo de transporte do SnCl_2 e $\text{NaTc}^{99\text{m}}\text{O}_4$ para o interior das hemácias.....	27
1.6 <i>Escherichia coli</i>	29
1.7 O uso de extratos vegetais na medicina popular.....	29
2. Materiais e métodos	
2.1 Obtenção do material.....	34
2.2 Animais.....	34
2.3 Obtenção do extrato etanólico de <i>Curatella americana</i>	34
2.4 Técnicas laboratoriais.....	35
2.4.1 Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas e celulares com Tc-99m.....	35

2.4.2 Biodistribuição.....	36
2.4.3 Contagem da radiação.....	36
2.4.4 Cálculo da porcentagem de radioatividade.....	36
2.4.5 Análise morfométrica.....	37
2.4.6 Cultura bacteriana.....	38
2.4.7 Análise estatística.....	40
3. Resultados.....	41
4. Discussão.....	47
5. Conclusões.....	53
6. Referências bibliográficas.....	54

Lista de abreviações

%ATI	Porcentagem da radioatividade	KeV	Quilo eletronsvolts
Al ₂ O ₃	Alumina	Mo-99	Molibdênio-99
Bq	Bequerel	MoO ₄ ⁻²	Molibdato
C	Hemácias	NaCl 0,9%	Solução salina
C-14	Carbono-14	Na ^{99m} TcO ₄	Pertecnetato de sódio
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear	P-32	Fósforo-32
CPM	Contagens por minuto	RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucléico	SnCl ₂	Cloreto estanoso
EA	Elétrons Auger	SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i>
ECI	Elétron de conversão interna	SPET	<i>Single photon emission tomography</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio	Tc-99m	Tecnécio 99M
FI-C	Fração insolúvel das células	TCA	Ácido tricloroacético
FI-P	Fração insolúvel do plasma	U-235	Urânio 235
H-3	Tritio		

Lista de ilustrações

Quadro 1: Características de tecnécio-99m.....	20
Quadro 2: Porcentagem da distribuição do Sn^{2+} e TcO_4^- nos componentes sangüíneos após o processo de marcação de hemácias.....	26
Figura 1: <i>Curatella americana</i> L. (Dilleniaceae).....	31
Tabela 1: Efeitos de diferentes concentrações de <i>C. americana</i> na marcação <i>in vitro</i> com Tc-99m em hemácias, proteínas plasmáticas e celulares.....	41
Tabela 2: Interferência do extrato de <i>C. americana</i> após cinco dias de tratamento (250 mg/Kg) na marcação <i>in vivo/in vitro</i> com Tc-99m em hemácias, proteínas plasmáticas e celulares.....	42
Tabela 3: Efeito do extrato de <i>C. americana</i> (250 mg/Kg) na biodistribuição do Tc-99M após tratamento por cinco dias consecutivos (VO)	43
Figura 2: Curva de inativação de culturas de <i>E. coli</i> AB1157 tratadas com diferentes concentrações do extrato de <i>C. americana</i>	44
Tabela 4: Morfometria de hemácias (tratamento <i>in vitro</i>)	45
Figura 3: Fotomicrografia de esfregaços sangüíneos obtidos de amostra de sangue submetidas à marcação com Tc-99M onde, A: controle; B: 100%; C: 50%; D: 25%; E: 12,5%; F: 6,25%.....	46

Resumo

O tecnécio 99-m (Tc-99m), na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), é um radiofármaco empregado em avaliações clínicas da medicina nuclear. A *Curatella americana* é uma planta de cerrado cuja parte utilizada é a casca do caule com uso antiulcerogênico. Tem sido descrito que a interação de drogas altera a biodistribuição dos radiofármacos, bem como sua ligação aos elementos sanguíneos ou a outras moléculas, o que pode alterar diagnósticos usando radiofármacos. Portanto, para contribuir com o estudo de como outras substâncias podem interferir na marcação do Tc-99m e também com a finalidade de elucidar efeitos biológicos *in vitro*, foram estudados os efeitos da *C. americana* sobre a marcação de elementos sanguíneos. Os resultados obtidos *in vitro* mostram que houve diminuição significativa ($p < 0,001$) na porcentagem de fixação do Tc-99m em hemácias entre o grupo controle ($97,0 \pm 2,00$) e os grupos tratados com *C. americana* 100%; 50%; 25%; 12,5%, 6,2%, 3,1%, 1,6%, 0,8% ($49,3 \pm 6,7$; $48,9 \pm 5,2$; $44,2 \pm 9,9$; $48,1 \pm 4,7$; $35,3 \pm 7,1$; $37,3 \pm 10,2$; $34,1 \pm 3,8$; $41,2 \pm 2,1$; respectivamente), onde 100% corresponde à concentração máxima utilizada do extrato vegetal, ou seja, 5 mg/mL; 50%; 25%; 12,5%, 6,2%, 3,1%, 1,6%, 0,8% correspondem às diluições 1:1 subseqüentes do grupo 100%. Na fixação do Tc-99m em proteínas celulares foi possível observar, também, redução da fixação do grupo controle ($79,6 \pm 2,9$) em relação aos seguintes grupos tratados 100%; 50%; 25%; 12,5%, 6,2%, 3,1% ($41,5 \pm 8,8$; $39,6 \pm 16,6$; $44,1 \pm 12,1$; $43,9 \pm 12,7$; $42,7 \pm 8,7$; $44,5 \pm 1,7$; respectivamente). *C. americana* não alterou significativamente a marcação das proteínas plasmáticas com Tc-99m. Em animais tratados com doses de 250 mg/Kg, via oral, por cinco dias consecutivos com extrato de *C. americana* constatou-se que a porcentagem de captação de Tc-99m aumentou significativamente nos pulmões (de $0,3 \pm 0,07$ para $0,5 \pm 0,2$), duodeno (de $0,3 \pm 0,2$ para $0,5 \pm 0,1$) e músculo (de $0,09 \pm 0,02$ para $0,1 \pm 0,04$) controle e tratado,

respectivamente ($p < 0,05$), e no pâncreas (de $0,1 \pm 0,03$ para $0,3 \pm 0,07$) controle e tratado, respectivamente ($p < 0,01$). Também foram observadas alterações morfológicas nas hemácias tratadas *in vitro* com o extrato, mesmo em baixas concentrações, alterando a forma da hemácia e, portanto, diminuindo significativamente a relação perímetro/área de $0,9 \pm 0,2$ (controle) para $0,7 \pm 0,03$; $0,7 \pm 0,05$; $0,7 \pm 0,02$; $0,6 \pm 0,05$; $0,7 \pm 0,03$ (6,2%; 12,5%; 25%, 50%, 100%, respectivamente); estes resultados poderiam justificar a redução da fixação do Tc-99m nas hemácias. Também foi estudado o efeito da incubação do extrato com culturas de *Escherichia coli* AB 1157 houve ainda diminuição na taxa de sobrevivência de *Escherichia coli* indicando uma citotoxicidade relativamente baixa do extrato, tendo em vista que as quedas mais significativas ocorreram somente nas maiores concentrações utilizadas do extrato de *C. americana* e após terem sido decorridas cerca de 20 minutos do início do cultivo do microorganismo.

Abstract

Technetium 99m (Tc-99m), as sodium pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), is a radionuclide employed in nuclear medicine clinical evaluations. *Curatella americana* is a plant from the Brazilian "cerrado" and its bark is used as antiulcerogenic. It has been described that the interaction of drugs alters the biodistribution of radionuclides, as well as its binding to blood elements or to other molecules, what may alter an examination. So, to contribute with this study, we have studied how other substances interfere on the labeling of Tc-99m and also to elucidate the biological effects *in vitro* the interference of *C. americana* in this process was studied too. The results obtained through the *in vitro* labeling of blood elements showed that there was a significant decrease ($p < 0,001$) in the fixation of Tc-99m in red blood cells between the control group (97.0 ± 2.0) and the treated groups 100%; 50%; 25%; 12.5%, 6.2%, 3.1%, 1.6%, 0.8% ($49.3 \pm 6,7$; 48.9 ± 5.2 ; 44.2 ± 9.9 ; 48.1 ± 4.7 ; 35.3 ± 7.1 ; 37.3 ± 10.2 ; 34.1 ± 3.8 ; 41.2 ± 2.1 ; respectively), where 100% corresponds to the maximum concentration used equal to 5 mg/mL, and 50%; 25%; 12.5%, 6.2%, 3.1%, 1.6%, 0.8% correspond to 100% subsequent dilutions. Regarding the fixation of Tc-99m in cellular protein, there was, also, a decrease in the control group (79.6 ± 2.9) with regard to the following treated groups 100%; 50%; 25%; 12.5%, 6.2%, 3.1% (41.5 ± 8.8 ; 39.6 ± 16.6 ; 44.1 ± 12.1 ; 43.9 ± 12.7 ; 42.7 ± 8.7 ; 44.5 ± 1.7 ; respectively). No significative alterations were observed on the labeling of plasma proteins with Tc-99m. Among animals treated with the extract it was verified an increase in the bond of Tc-99m on lungs (from 0.3 ± 0.07 to 0.5 ± 0.2), duodenum (from 0.3 ± 0.2 to 0.5 ± 0.1) and muscle (from 0.09 ± 0.02 to 0.1 ± 0.04) control and treated groups, respectively ($p < 0.05$); pancreas (from 0.1 ± 0.03 to 0.26 ± 0.07) control and treated groups, respectively ($p < 0.01$). Morphological alterations were observed in red blood cells treated *in vitro* with the extract even under low concentrations, altering the shape of red blood cells significantly and so that,

decreasing the perimeter/area relation from 0.9 ± 0.2 (control) to 0.7 ± 0.03 ; 0.7 ± 0.05 ; 0.7 ± 0.02 ; 0.6 ± 0.05 ; 0.7 ± 0.03 (6.2%; 12.5%; 25%, 50%, 100%, respectively). These results could explain the decrease in the fixation of Tc-99m on red blood cells. After the incubation of the extract with cultures of *Escherichia coli* AB 1157 there was a decrease in the survival fraction of this microorganism. This decrease indicated a relatively low cytotoxicity of the extract considering that the most significant drop occurred due to the time and concentration of the extract.

1. Introdução

1.1 Considerações gerais

A descoberta das radiações ionizantes e dos compostos dotados de radioatividade natural logo interessou à biologia e às ciências médicas. O interesse surgiu devido aos danos causados às estruturas vivas e também pelo valor como meio de auxiliar o diagnóstico e o tratamento de doenças (GARCIA, 2000).

Durante os últimos anos a ciência aprendeu a produzir, manipular e controlar as substâncias radioativas, permitindo que os processos envolvidos em sua produção, armazenamento e uso se tornassem mais seguros. Os elementos químicos existentes na natureza apresentam isótopos radioativos; outros podem ser gerados pelo bombardeamento nos reatores nucleares ou nos aceleradores de partículas. Por isso, os radioisótopos podem ser genericamente classificados em naturais ou artificiais (GARCIA, 2000).

A emissão radioativa altera profundamente a estrutura atômica do elemento emissor, pois modifica a composição e o balanço energético do seu núcleo. Os núcleos instáveis dissipam o excesso de energia que possuem emitindo radiações. Os isótopos que emitem radiação são chamados mais apropriadamente de radionuclídeos (GARCIA, 2000).

As aplicações dos radioisótopos em medicina são múltiplas; entretanto, os maiores usos são como fontes de radiação e como traçadores. No primeiro caso, o material biológico recebe apenas as radiações emitidas pelo radionuclídeo usado; no segundo, o próprio radioisótopo é incorporado ao meio biológico que se deseja estudar (KNAPP e MERZADETH, 1994).

Os traçadores que apresentam características bem definidas para o emprego em

seres humanos são denominadas de radiofármacos. Desta forma, um radiofármaco pode ser definido simplesmente como uma substância ou célula que contém um átomo radioativo em sua estrutura e que, devido à forma farmacêutica, quantidade e qualidade de radiação emitida, sua administração torna-se apropriada para uso em seres humanos com fim de diagnóstico ou tratamento de doenças, qualquer que seja a via de administração (SAHA, 1998).

Os radiofármacos, geralmente, não possuem efeito farmacológico porque, na maioria dos casos, são usados em quantidades mínimas. Nestes casos, não mostram qualquer relação dose-resposta, diferindo então das drogas convencionais. Por serem administrados em seres humanos, os radiofármacos são estéreis, atóxicos e livres de pirógenos, devendo ser submetidos a todas as medidas requeridas pelo controle de qualidade de uma droga convencional (SAHA, 1998).

Em medicina nuclear os radiofármacos são utilizados: (a) para obtenção de imagens onde um radiofármaco, com seletividade por um órgão e/ou sistema, é administrado e a radiação emitida é captada externamente, transformada ou registrada em papel, filme ou monitor de vídeo; (b) estudo de funções *in vivo* avaliando a função de um órgão ou sistema, em particular baseado na absorção, diluição, concentração ou excreção da radioatividade após administração do radiofármaco; (c) procedimentos terapêuticos, onde um órgão ou tecido específico é selecionado e, através da emissão de radiação beta, o tecido é destruído (BAUM, 1987).

A primeira etapa na preparação de radiofármacos é a produção de um radionuclídeo apropriado. Existem duas fontes principais para a produção de radionuclídeos as quais são usadas nos procedimentos em medicina nuclear, as fontes primária e secundária. A fonte primária envolve a produção direta de radionuclídeos, tanto com um reator nuclear quanto com um acelerador de partícula. A fonte secundária é um método indireto de se

produzir radionuclídeos usando um sistema de gerador o qual é construído de modo que seja quimicamente fácil de separar o radionuclídeo “filho” do radionuclídeo “pai” em hospitais locais ou radiofarmácias centrais (OWUNWANNE et al., 1995).

Portanto, o crescente emprego de radionuclídeos na área biomédica tem possibilitado a elucidação de inúmeros fenômenos que ocorrem nos seres vivos, inclusive no homem. Em relação aos seres humanos, os radionuclídeos são amplamente utilizados em medicina nuclear, tanto em procedimentos de diagnóstico quanto em terapia (HLADIK III et al., 1987; EARLY e SODEE, 1995; SAHA, 1998). Essa utilização é interessante pelo fato das doses administradas em diagnóstico acarretarem uma baixa exposição do paciente à radioatividade e produzirem imagens de excelente qualidade. Por outro lado, é importante lembrar os possíveis efeitos deletérios nos sistemas biológicos, relacionados ao decaimento de isótopos radioativos como o carbono-14 (C-14), o tecnécio-99m (Tc-99m), o trítio (H-3) e o fósforo (P-32), entre outros (EARLY e SODEE, 1995).

A câmara gama ou câmara de cintilação é o principal instrumento usado para obtenção de imagens cintigráficas. Os cintiladores baseiam-se na propriedade de certos cristais que, após terem sido excitados por uma radiação incidente, quando retornam ao seu nível fundamental de energia, emitem fótons de luz visível que podem ser detectados e registrados por circuitos eletrônicos (PERKINS e FRIER, 1999).

Os equipamentos disponíveis para obtenção de imagens em medicina nuclear baseiam-se no emprego de radionuclídeos emissores de radiação gama ou raio-X característico por processos cintilográficos tais como SPECT (single photon emission computed tomography) ou SPET (single photon emission tomography). Esta radiação é emitida pela desativação dos isômeros nucleares (gama) ou no processo de captura eletrônica (gama e/ou raio-X característico) (HARBER et al., 1996).

1.2Tecnécio-99m

Apesar de vários radionuclídeos serem utilizados na marcação dos radiofármacos, o Tc-99m teve sua utilização progressivamente aumentada e hoje está presente em muitos centros de medicina nuclear em mais de 80% dos exames. O crescimento do uso do Tc-99m em estudos na área biomédica se deve a uma série de características de natureza física, química e biológica; estas características estão indicadas no quadro 1 (HLADIK III et al., 1987; EARLY e SODEE, 1995; HARBER et al., 1996).

Quadro 1. Características de tecnécio-99m

Metal de transição pertencente ao grupo VII

Estados de oxidação (-1 a +7)

Meia-vida de 6 horas

Fácil obtenção através de geradores Mo-99/Tc-99m

Emissão gama de 140 keV com abundância de 90%

Ótimo para realização de cintilografia em câmara gama

Energia corpuscular desprezível

Rejeitos radioativos praticamente desprezíveis

Impacto ambiental desprezível

Marcação de diferentes espécies moleculares e celulares

Mínima dose absorvida pelo paciente

SAHA, 1998

O tecnécio é obtido na forma de pertecnetato de sódio ($\text{NaTc}^{99\text{m}}\text{O}_4$) a partir de geradores molibdênio-99/tecnécio-99m (Mo-99/Tc-99m), os quais são construídos com

alumina (Al_2O_3) condicionada em uma coluna de plástico ou de vidro. O Mo-99 é adsorvido na alumina na forma química de molibdato (MoO_4^{2-}). Na preparação, a coluna é rotineiramente lavada com solução salina para remover a radioatividade indesejável. A quantidade de alumina usada é da ordem de 5 g a 10 g, dependendo da atividade total do Mo-99. As colunas dos geradores são protegidas com chumbo. Geralmente os geradores Mo-99/Tc-99m são produzidos com Mo-99 obtido por fissão de urânio 235 (U-235) (EARLY e SODEE, 1995).

O Tc-99m possui grande facilidade de formar complexos e quelantes com moléculas variadas, favorecendo a obtenção de diversos radiofármacos (HLADIK III et al., 1987; SRIVASTAVA e STRAUB, 1990; SRIVASTAVA, 1996).

Embora apresente muitas vantagens em relação a outros radionuclídeos usados nas ciências médicas, o contato do Tc-99m com moléculas biológicas pode acarretar diversos tipos de lesões, dentre as quais são particularmente importantes as que possam alterar o ácido desoxirribonucléico (DNA), com óbvios riscos à própria espécie. Este radionuclídeo tem associado ao seu decaimento a emissão de elétrons Auger (EA, 15-21 keV) e elétron de conversão interna (ECI, 128-138 keV) (SAHA, 1998; SILVA et al., 1998; BERNARDO-FILHO, 1999).

Estas emissões são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio sobre o qual incidem e podem também interagir diretamente com as células presentes nesse meio. Alguns efeitos lesivos dessas emissões já se encontram descritos na literatura, tais como danos nos cromossomos, inibição da divisão celular de leucócitos marcados com Tc-99m e citotoxicidade em *Escherichia coli* (SILVA et al., 1998).

O pertecnetato de sódio, após a administração intravenosa, é distribuído no compartimento vascular. Cerca de 70 a 80% dos íons pertecnetato ligam-se, inicialmente, às proteínas plasmáticas, sendo esta ligação reversível. A eliminação plasmática é muito

rápida e o equilíbrio entre o compartimento vascular e o fluido intersticial é completado em 2 a 3 minutos.

Sua meia-vida de eliminação no plasma é de aproximadamente 30 minutos; 30% da dose administrada é excretada nas primeiras 24 horas. O total de excreção urinária e fecal do Tc-99m é cerca de 50% em 3 dias e 70% em 8 dias (HLADIK III et al., 1987).

A dose administrada de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ varia com o tipo de estudo a ser realizado, sendo usadas cerca de 10 a 20 mCi para a imagem cerebral, 1 a 5 mCi para tireóide e de 20 a 25 mCi para a marcação *in vivo* dos eritrócitos (HLADIK III et al., 1987).

1.3 Agente redutor

O processo de marcação de células e moléculas com o Tc-99m necessita da utilização de um agente redutor, visto que o eluído obtido no gerador, como íon pertecnetato, não se liga facilmente a outras espécies químicas. Por essa razão, torna-se necessária a redução deste radionuclídeo da valência +7 para valências mais baixas, ou seja, +3, +4, +5 (SAHA, 1998).

A redução do íon pertecnetato pode ser obtida através de diferentes agentes químicos, sendo que o cloreto estano (SnCl₂) é o agente redutor mais freqüentemente utilizado para esta finalidade (DEWANJEE, 1990; SRIVASTAVA e STRAUB, 1990; HARBER et al., 1996). A utilização do SnCl₂ possibilita a marcação de inúmeras moléculas e de diferentes tipos celulares dispensando, normalmente, uma etapa adicional de purificação.

O uso do íon estano foi à chave para o desenvolvimento de muitos radiofármacos. Nenhum agente redutor mostrou, até o momento, uma eficiência de marcação do traçador radioativo superior à obtida com o uso do cloreto estano justificando, assim, a sua preferência não só na medicina nuclear, mas também na marcação de diversas estruturas

de interesse biomédico (RAO et al., 1986; SAHA, 1998; BERNARDO-FILHO, 1999).

Embora o SnCl_2 seja empregado em concentrações mínimas, na marcação de um variado número de estruturas, alguns efeitos nocivos dessa substância têm sido descritos (BERNARDO-FILHO et al., 1994; DANTAS et al., 1996). Sugere-se que, durante reações de oxi-redução, o SnCl_2 poderia estar gerando EROs. Isto se explica pelo fato do SnCl_2 atuar como agente redutor e ter uma grande afinidade pelo oxigênio que, por sua vez, é um excelente agente oxidante. Uma das características de importância biológica do SnCl_2 consiste na sua capacidade de formar compostos catiônicos organometálicos de alta solubilidade lipídica, capacitando-os a atravessar membranas biológicas e a exercer seus efeitos biológicos tóxicos no interior das células (DANTAS et al., 1996).

1.4 Sangue

O sangue possui, além das células vermelhas e brancas, outros constituintes que não são elementos celulares.

1.4.1 Constituintes plasmáticos

Embora, sob este item possam ser analisados constituintes diversos, as proteínas plasmáticas são, sem dúvida, os mais importantes.

As proteínas plasmáticas exercem papéis: (a) na regulação do transporte de água ou de outras substâncias devido à sua força osmótica no interior do sistema (bilirrubina, lipídeos, medicamentos, radiofármacos e outros); (b) manutenção do equilíbrio físico-coloidal na suspensão celular sangüínea; as alterações deste equilíbrio estão relacionadas à velocidade de sedimentação globular; (c) a intervenção no combate infeccioso atuando como vetores de anticorpos na coagulação e (d) atividade como anfólitos amortizadores na regulação do pH sangüíneo. As proteínas plasmáticas, no plasma sangüíneo, fixam-se

à molécula e desprendem-se ao chegar a determinados órgãos; a função de transporte de radiofármacos pelas proteínas plasmáticas é, em grande parte, responsável pelas biodistribuições desiguais dos traçadores radioativos.

Enquanto que fibrinogênio e protrombina são formados nos hepatócitos, é no sistema reticulocelular da medula óssea e dos gânglios linfáticos que originam-se as proteínas plasmáticas. A concentração de proteínas no plasma varia normalmente de 5,7 a 8,0 g/dL. Essas proteínas podem ser separadas e avaliadas por eletroforese que decompõe o soro em seis frações principais: albumina (54 a 58%), α_1 globulinas (6 a 7%), α_2 globulinas (8 a 9%), β_1 globulinas (13 a 14%), γ globulinas (11 a 12%) e fibrinogênio (3 a 4%) sendo que independente da classe as proteínas plasmáticas podem ser precipitadas por vários agentes como o ácido tricloroacético (TCA) (FREITAS et al., 1996).

A albumina liga-se a metabólitos insolúveis e serve como proteína de transporte. As globulinas são um grupo diverso de proteínas que incluem os anticorpos e determinadas proteínas responsáveis pelo transporte de lipídeos e alguns íons de metais pesados. O fibrinogênio é uma proteína solúvel que se polimeriza para formar a fibrina durante a coagulação sanguínea (SMITH et al., 1985).

No processo de marcação de hemácias com Tc-99m, que será analisado detalhadamente a seguir, as proteínas plasmáticas também podem ligar-se com esse radionuclídeo (Bernardo-Filho, 1999). Ao administrar um radiofármaco a um paciente sempre uma fração do mesmo é encontrada ligada às proteínas plasmáticas (HLADIK III et al., 1987; SANTOS et al., 1995; HARBER et al., 1996).

1.4.2 Estrutura das hemácias

A microscopia eletrônica de varredura revela a forma de disco bicôncavo das hemácias, proporcionando uma área de superfície 20-30% maior que a de uma esfera,

aumentando assim significativamente as trocas gasosas. Esta forma, juntamente com a fluidez da membrana, permite que a hemácia deforme-se facilmente. Assim, as hemácias com um diâmetro médio de 7,2 μm são capazes de passar através de capilares com 3-4 μm (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

As membranas das hemácias possuem várias proteínas, que são de dois tipos: (a) proteínas integrantes, que estão firmemente fixadas na bicamada lipídica; (b) proteínas extrínsecas que estão ligadas não-covalentemente às proteínas integrantes da membrana. Das proteínas integrantes da membrana da hemácia, a glicoforina (nome derivado do grego que significa “carreador de açúcar”) parece desempenhar apenas um papel estrutural, embora seja responsável por determinantes de grupos sangüíneos (ALBERTS et al., 1996).

Várias glicoenzimas foram identificadas sobre a superfície celular. Algumas dessas glicoenzimas estão envolvidas diretamente no transporte através da membrana; entretanto, outras preparam suas substâncias convertendo-as para que possam ser levadas por outros sistemas de transporte. As enzimas reguladoras da síntese de constituintes celulares, tais como acetilcolinesterase, aldeído desidrogenase, anidrase carbônica, descarboxilase dopa, monoaminoxidase e xantina oxidase, mostram-se afetadas pelas drogas usadas clinicamente e que alcançam níveis sangüíneos e tissulares significativos (HLADIK III et al., 1987).

O processo de marcação de hemácias com Tc-99m representa uma das técnicas de maior importância na medicina nuclear; e tem sofrido aperfeiçoamento contínuo com o passar dos anos em resposta ao grande número de exames clínicos em que é utilizado. A hemácia é uma dentre as várias estruturas celulares que são marcadas com este radionuclídeo (SAMPSON, 1996; BERNARDO-FILHO, 1999).

A marcação de hemácias é facilitada por vários fatores: (a) é a célula sangüínea

mais abundante (5×10^9 células/mL de sangue); (b) é de fácil isolamento e manuseio sendo pouco suscetível a danos por manipulação física ou química; (c) não depende de energia nutricional *in vitro* como outros elementos celulares; (d) é facilmente marcada devido à variedade de mecanismos de transporte celular e pela presença da hemoglobina, rica em sítios ativos de ligação para metais. Conseqüentemente, a marcação de hemácias também tem servido como um modelo simples, conveniente e útil no estudo do transporte, estrutura e função da membrana (SRIVASTAVA e STRAUB, 1990).

As metodologias empregadas para marcação de hemácias com Tc-99m são bem diversificadas (THOMPSON et al., 1981; CALLAHAN et al., 1982; BERNARDO-FILHO et al., 1983; OWUNWANNE et al., 1995). Nos métodos que empregam a marcação *in vitro* o sangue é retirado do paciente/animal e incubado com o íon estanoso e, posteriormente, com o íon pertecnetato. Na marcação *in vivo*, depois da injeção endovenosa do composto contendo estanho no paciente/animal, é feita a administração do Tc-99m pela mesma via. Um outro modo de se obter hemácias marcadas com este radioisótopo consiste no método *in vivo/in vitro*, o que corresponde à injeção endovenosa do íon estanoso e, após coleta de sangue, à incubação *in vitro* com o Tc-99m; o material é então novamente injetado no paciente/animal (BAUM, 1987; EARLY e SODEE, 1995). A hemoglobina, juntamente com outros componentes intracelulares, é um sítio de ligação dos radionuclídeos com as hemácias, como pode ser observado no quadro 2 (DEWANJEE et al., 1982; SRIVASTAVA e STRAUB, 1990).

O mecanismo que envolve a ligação do Tc-99m com as hemácias não é completamente entendido. Ainda assim, têm sido acumuladas evidências suficientes para sustentar algumas conclusões: (a) o íon estanoso, ligado ao citrato, se difunde para dentro das células e liga-se ao componente celular; (b) o íon pertecnetato se difunde livremente dentro e fora da célula; (c) ao mesmo tempo, o pertecnetato dentro da célula, na presença

do íon estano, é reduzido e se liga principalmente à fração globina da hemoglobina; (d) a ligação do Tc-99m com a globina é predominantemente na cadeia β (DEWANJEE et al., 1982).

Quadro 2. Porcentagem da distribuição do Sn^{2+} e TcO_4^- nos componentes sanguíneos após o processo de marcação de hemácias.

Fração ou componentes	Íon estano (Sn^{2+}) (%)	Pertecnetato (TcO_4^-) (%)
Ligado com membrana	$5,7 \pm 2,9$	$1,7 \pm 0,3$
Não ligado com membrana	$18,3 \pm 5,1$	$94,8 \pm 2,0$
Heme	-	$17,3 \pm 6,5$
Globina	-	$77,4 \pm 9,7$
Sangue total	$25,7 \pm 0,3$	$96,5 \pm 2,0$
Plasma	$73,3 \pm 4,2$	$2,7 \pm 1,7$

SRIVASTAVA e STRAUB, 1990

1.5 Modelo de transporte do SnCl_2 e $\text{NaTc}^{99\text{m}}\text{O}_4$ para o interior das hemácias

As proteínas que compõem a membrana da hemácia contêm regiões com seqüências hidrofóbicas nas suas cadeias polipeptídicas que se ligam fortemente aos fosfolípidos da bicamada fixando as proteínas à membrana plasmática. Uma dessas proteínas é a banda-3 que constitui cerca de 25% das proteínas; cada hemácia tem cerca de 10^6 exemplares dessa proteína integral. Trata-se de uma glicoproteína constituída de duas cadeias polipeptídicas idênticas que apresentam um domínio extracelular, um intracelular e um transmembrana. Além de desempenhar um papel estrutural na fixação de citoesqueleto à membrana, a banda-3 constitui a principal proteína no transporte de ânions das hemácias, estando envolvida na difusão facilitada de íons cloreto que, por sua vez, atuam durante o processo de transporte de O_2 e CO_2 (SMITH et al., 1985; CALLAHAN e

RABITO, 1990).

Espécies reduzidas de tecnécio geralmente não são transportadas através da membrana celular (SRIVASTAVA e STRAUB, 1990). Estes fatos indicam que o processo de marcação ocorre em nível intracelular. Somando-se a isso, o agente redutor parece ser transportado também para o interior da hemácia por um sistema de transporte específico, o canal de cálcio (DEWANJEE et al., 1982; CALLAHAN e RABITO, 1990; SAMPSON, 1996).

O influxo de cálcio pode ocorrer por difusão facilitada (em um carreador único ou em um anticarreador) ou ainda através de canais de cálcio voltagem dependentes. Dessa forma, se torna evidente que uma hemácia, sendo desprovida de núcleo, mitocôndria e de retículo endoplasmático, depende exclusivamente do transporte de cálcio através da membrana plasmática para regular o nível deste íon intracelularmente (SCHATZMANN, 1993).

Estudos baseados nas similaridades entre o íon cálcio e o estanoso, utilizando drogas bloqueadoras de canais de cálcio, demonstraram que estas eram capazes de diminuir a marcação de hemácias; assim, esse efeito inibitório indica que o íon estanoso parece penetrar no interior da hemácia pelos mesmos canais que o íon cálcio (SAMPSON, 1996).

A distribuição de radiotraçadores baseia-se nos princípios farmacocinéticos descritos para agentes terapêuticos em geral, incluindo a relação estrutura-atividade e a ligação a receptores específicos. Assim, um radiofármaco quando administrado a um paciente submetido à diferentes drogas, pode sofrer alterações em sua biodistribuição, desviando-se do seu órgão alvo (HLADIK III et al., 1987).

A interação com muitas drogas medicamentosas é um dos fatores que tem merecido grande atenção por parte dos pesquisadores uma vez que pode: (a) modificar a natureza

química do radiofármaco, (b) alterar o meio bioquímico do alvo no qual o radiofármaco está exposto, (c) alterar o meio bioquímico que não é alvo para o radiofármaco; e (d) favorecer ou danificar a ligação do radiofármaco às proteínas plasmáticas e aos elementos sangüíneos. Uma grande quantidade de drogas utilizadas em tratamento pode, ainda, exercer seu efeito terapêutico mimetizando os sintomas de outras doenças (HLADIK III et al., 1987; SRIVASTAVA e STRAUB, 1990, SAMPSON, 1996). Dessa forma, a distribuição normal dos radiotraçadores pode ser alterada, resultando em diagnósticos imprecisos e também levando à repetição de exames e, portanto, expondo o paciente a doses de radiação desnecessárias (HLADIK III et al., 1987, HICKS et al., 1992; BERNARDO-FILHO et al., 1994; SANTOS et al., 1995; EISING e REINERS, 1998).

Por último, um grande número de trabalhos relata que certas drogas utilizadas na marcação de hemácias podem originar uma série de alterações estruturais, bioquímicas e morfológicas nas hemácias. Isto, conseqüentemente, causa danos ao organismo, tais como: anemia hemolítica, hemólise oxidativa, anemia megaloblástica, alterações da membrana celular, entre outros. Apesar da alta eficiência da marcação de hemácias pela técnica acima descrita, existem evidências de que algumas substâncias, entre eles medicamentos e extratos vegetais, podem também produzir efeitos na marcação e na biodistribuição com Tc-99m (SAMPSON, 1996).

1.6 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*), uma bactéria gram-negativa, em forma de bastonete, da família das *Enterobacteriaceae*, é conhecida desde os primeiros estudos bacteriológicos como membro comum da flora intestinal.

Este organismo tem sido alvo de intensa investigação em laboratórios de pesquisa por quase um século, o que pode ser intrigante pois ela não se diferencia (como a

Caulobacter), não esporula (como o *Bacillus*), não fixa nitrogênio (como a *Klebsiella*), não faz fotossíntese (como a *Rhodospirillum*), não faz quimiossíntese (como a *Nitrosomonas*), não excreta grande quantidade de proteína (como o *Bacillus*), nem cresce em ambientes exóticos (como o *Thermus* ou *Thiobacillus*).

E. coli pode competir com forte estresse ambiental e desenvolveu uma série de “reações alarmes” que a permitem reparar danos no DNA e impedir a síntese de RNA indesejado, ou proteger sua membrana. Muitas destas respostas levam ao impedimento ou “ligamento” de macromoléculas específicas. O número de artifícios regulatórios é grande e, provavelmente, vai além da nossa compreensão. O impedimento da expressão de um gene durante a transcrição ou tradução assume um número desconcertante de versões. Mesmo depois das proteínas serem sintetizadas, sua atividade ou estabilidade pode ser modificada.

Segundo SCHAECHTER e NEIDHARDT (1987), um objetivo central na biologia é a realização de um paradigma celular. Eles afirmam que até entendermos completamente o crescimento de uma célula, deveríamos imaginar a natureza do entendimento de qualquer célula. Ainda, questionam que a *E. coli* oferece a melhor oportunidade de alcançar este paradigma dando duas razões: “estes organismos podem ser estudados por técnicas genéticas e moleculares incomparáveis e possuem uma vantagem inicial singular.”

1.7O uso de extratos vegetais na medicina popular

O uso de plantas medicinais ou de produtos naturais tem crescido nas últimas décadas. O consumo de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular, resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos.

No Brasil, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições

trazidas por escravos e imigrantes representaram um papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original.

Atualmente, o crescente interesse da comunidade acadêmica em pesquisar os medicamentos naturais tem dado respaldo às drogas a base de ervas (SIMÕES, 1989). Dentre os diferentes efeitos biológicos estudados para espécies vegetais vários estão relacionados à marcação de hemácias com Tc-99m (VIDAL et al., 1998; REININGER et al., 1999; BERNARDO-FILHO, 1999; OLIVEIRA et al., 2000).

A espécie estudada nesse trabalho, no sentido de avaliar sua habilidade em interferir com a marcação de elementos sangüíneos nas diferentes técnicas empregadas, é a *Curatella americana* L. Essa espécie pertence à família *Dilleniaceae* e apresenta-se como árvore ou arbusto tortuoso de 1 a 12 m em cerradão (Fig. 1). É conhecida popularmente como lixeira, cajueiro-bravo, cajueiro-do-mato, cambarba, caimbé, marajoara, pentieira, sabeiba e sobro (LORENZI, 1992).

Esta espécie ocorre freqüentemente em cerrado com solos arenosos. Cresce na Amazônia e é de ampla dispersão neotropical em savanas, cerrados, matas secas semidecíduas e tabuleiros. Apesar da plântula frágil e de crescimento inicial lento, é invasora de pastagem (LORENZI, 1992). A espécie *C. americana* floresce nos meses de agosto e setembro, e frutifica em outubro e novembro. Sua casca grossa a protege contra fogo. As folhas são ásperas por apresentarem cristais de ácido silícico.

São conhecidas várias utilidades de *C. americana*. É usada como planta forrageira de emergência para vacas, pois não é tóxica, com composição de 8% de proteínas, 0,35% Ca, 0,16% P, 0,23% Mg, 11 ppm Cu e 17 ppm Zn. O arilo branco de seu fruto é comestível com sabor suave e adocicado (vermelho por dentro). É um alimento muito procurado pelas aves, que são suas dispersoras. *C. americana* também tem importância na apicultura e apresenta valor ornamental. Sua madeira é usada para pilão; é pesada, compacta com

fibras reversas, muito duráveis ao tempo, servindo para marcenaria, carpintaria, tornearia, canga, sela, escultura, lenha e carvão. A folha é usada como lixa para utensílios de chifre, panela, madeira, unhas, etc.

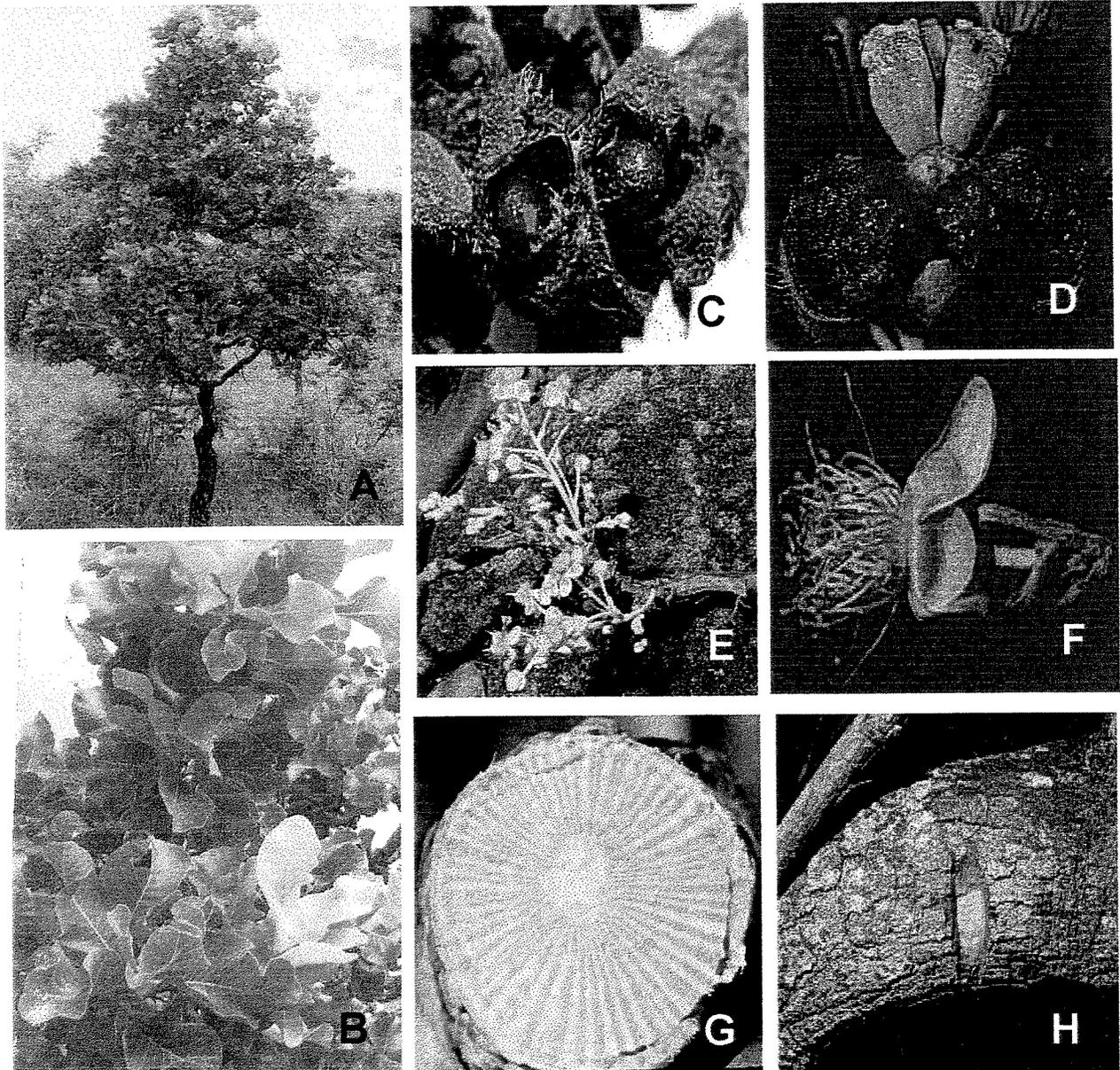


Figura 1. *Curatella americana* L. (Dilleniaceae). A) Planta inteira; B) Detalhe das folhas; C e D) Detalhe do fruto; E e F) Detalhe das flores; G e H) Detalhe do caule. Fonte: <http://www.uol.com.br/eadmelo/cerrd/lista.htm> (14/08/2003).

A medicina popular usa o decocto de cascas de *C. americana* para lavar feridas e

úlceras, inclusive de gado. É tida como medicinal contra artrite, diabetes e pressão alta. As flores são usadas contra tosse, bronquites e resfriados. No fruto, a parte vermelha apresenta um corante e suas cerdas são irritantes, causando alergia (LORENZI, 1992). Informações etnofarmacológicas indicam que o macerado de *C. americana* em água por uma noite é intensamente usado para afecções gástricas na região de Tocantins (Feitosa et al., 2000). Por esse motivo, foram realizados ensaios antiúlceras com esta planta para averiguar sua atividade (ANDRADE, 2002).

ANDRADE (2002) identificou e detectou catequina e alguns de seus derivados galato no extrato etanólico de *C. americana*. Existem estudos biológicos comprovando que a catequina e seus derivados, inclusive seus polímeros (os taninos condensados), apresentam atividades antiúlceras. Uma das principais atuações das catequinas nos sistemas vivos é a inibição enzimática. Elas inibem a ação da histidina descarboxilase, inibindo assim, a formação de histamina que é o sinal bioquímico para a produção do ácido clorídrico gástrico (LEWIS et al. 1991). Outra interação importante sobre o sistema enzimático é a inibição das cliclooxigenases, no processo de contração dos músculos lisos, em alguns processos antiinflamatórios, alérgicos e também gastrintestinais, pois essas enzimas catalisam a conversão de alguns ácidos graxos para a síntese de prostaglandinas, que são as substâncias responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica (HARBORNE, 1993;. LEWIS et al. 1991). A medicina popular da Indonésia utiliza o chá das folhas de *Artocarpus integra*, ricas em catequinas, para o tratamento de úlceras e outra afecções gastrintestinais (LEWIS et al., 1991).

Foram detectadas outras atividades biológicas dos derivados de catequina. Eles apresentam atividade comprovada contra 11 tipos de vírus e notou-se que os mais ativos eram 3-hidroxilados. A catequina foi, dentre os derivados testados, a substância que

apresentou a maior atividade contra os vírus da hepatite e apresentou também uma importante atividade hepatoprotetora (HARBORNE, 1993).

Em *C. americana* também foram identificados os triterpenóides de esqueletos lupano, oleanano e ursano. Foi possível a identificação do ácido ursólico, ácido oleanólico e seus acetatos e de betulinaldeído. Os triterpenos têm atividade bem conhecida nos mecanismos de proteção contra úlceras gástricas. Eles são excelentes estimulantes da síntese de muco, inibindo uma enzima redutase de prostaglandinas e permitem a manutenção de um alto nível de prostaglandina na mucosa gástrica. Outro mecanismo atribuído à ação dos triterpenos na proteção contra a úlcera é a inibição da secreção de pepsina (LEWIS et al., 1991).

Desse modo, foram objetivos dessa dissertação:

1. Avaliar o efeito do extrato bruto de *C. americana*, em diferentes concentrações, na marcação de hemácias e de proteínas plasmáticas com Tc-99m *in vivo* e *in vitro*,
2. Estudar a biodistribuição do extrato bruto de *C. americana* e a maneira com que ele interfere na biodistribuição do Tc-99m.
3. Avaliar possíveis alterações morfológicas nas hemácias isoladas de amostras de sangue marcadas com Tc-99M.
4. Verificar a citotoxicidade do extrato bruto de *C. americana* em cultura bacteriana.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção do material

O tecnécio-99m foi obtido do serviço de medicina nuclear do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), eluído de geradores Molibdênio ^{99/99m}Tecnécio, produzidos pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nuclear de São Paulo (IPEN), pertencente à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), Brasil.

2.2. Animais

Nos estudos foram utilizados ratos *Wistar*, adultos, fêmeas, com peso médio de 250 g, mantidos em câmaras para ratos, sob temperatura de 22°C, com fotoperíodo de 12h/12h e fornecimento de ração e água *ad libitum* no biotério do Departamento de Biofísica e Biometria – Instituto Alcântara Gomes – UERJ, onde os animais permaneceram até sua utilização acondicionados em gaiolas de vinil com maravalha de pinus.

2.3. Obtenção do extrato etanólico de *C. americana*

Em moinho de facas 450 g de cascas secas de *C. americana* foram trituradas. Em seguida, o material vegetal foi transferido para um recipiente de 4 L ao qual foi adicionado clorofórmio. A maceração com clorofórmio durou duas semanas sob agitação freqüente. Após o período de extração, a solução clorofórmica foi filtrada em gaze e em papel; em seguida, a mesma foi evaporada, à pressão reduzida, em roto-evaporador (30°C) obtendo-se 6 g de extrato clorofórmico. A torta restante no recipiente foi submetida à maceração com etanol. A extração durou outras duas semanas. Na seqüência, a solução etanólica foi

filtrada e seca em roto-evaporador (45 °C), com procedimento idêntico à solução clorofórmica. Foram obtidos aproximadamente 4 g de extrato etanólico.

2.4 Técnicas laboratoriais

2.4.1. Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas e celulares com Tc-99m

O extrato foi suspenso em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 5 mg/mL, doravante chamada de 100%, e suas diluições subseqüentes, ou seja, 50%; 25%; 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%. A concentração 100% corresponde à dose terapêutica do extrato (250 mg/Kg) em função da quantidade total de sangue do animal (DIEHL, 2001).

Os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca em volume suficiente para distribuir 0,5 mL em cada tubo (C; 100%; 50%; 25%; 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%; onde C = controle) e suas réplicas.

Nos tubos C foi adicionado 0,1 mL de salina e nos demais o mesmo volume do extrato da planta nas concentrações correspondentes (100%; 50%; 25%; 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%). Os tubos foram então tampados e se prosseguiu a encubação, à temperatura ambiente, por uma hora.

Após o período de uma hora foi adicionado 0,5 mL de cloreto estanoso (1,2 mg/mL), recentemente preparado a vácuo, e a solução final foi encubada por mais uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 0,1 mL de pertecnetato ($3,7 \times 10^6$ Bq) e a incubação prosseguiu por mais dez minutos.

As amostras foram então centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos) em centrífuga clínica Alpha ICA (Instrumentos Científicos Alpha Ltda.). Alíquotas de plasma (P) e células (C) foram separadas e a porcentagem de atividades (% ATI) foi calculada.

Para avaliar o efeito do extrato bruto de *C. americana* na ligação do Tc-99m às proteínas plasmáticas e celulares, alíquotas de P e C (20 µL) foram precipitadas em 1ml de ácido tricloroacético (TCA 5%), sendo então, centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos) e isoladas as frações solúvel (FS) e insolúvel (FI) de P e C.

2.4.2. Biodistribuição

Os animais foram tratados por cinco dias com o extrato bruto de *C. americana* (250 mg/Kg) e salina (controle) por gavagem. Após 24 horas da última administração os animais foram anestesiados com halotano e foi retirado 1mL de sangue de cada animal por punção cardíaca, sendo que esse sangue foi analisado seguindo o protocolo descrito no item 2.4.1 a partir da encubação com cloreto estanoso.

Foram aguardados 90 minutos para restabelecimento dos animais e após este tempo, 0,3 mL de pertecnetato foram administrados endovenosamente pelo plexo ocular, com os animais também anestesiados com halotano.

Após 10 minutos os animais foram então sacrificados e os seguintes órgãos foram retirados: tireóide, estômago, duodeno, rins, fígado, pâncreas, cérebro, osso (fêmur), pulmões, coração, baço e músculo (reto da coxa). Os órgãos foram pesados e colocados no tubo do contador para contagem da radioatividade.

2.4.3. Contagem da radiação

A contagem da radioatividade foi efetuada no Automatic Gamma Counter, modelo C 5002 (Packard, Canadá) provido de cintilador de poço com cristal de iodeto de sódio, seguindo as normas de proteção radiológica da Comissão Nacional de Energia Nuclear.

2.4.4 Cálculo da porcentagem de radioatividade

A porcentagem da radioatividade incorporada aos elementos sangüíneos (%ATI) foi calculada segundo as fórmulas abaixo:

$$\%ATI \text{ células} = \frac{CPM (C)}{CPM (P) + CPM (C)}$$

$$\%ATI \text{ FI-P} = \frac{CPM (FI-P)}{CPM (FS-P) + CPM (FI-P)}$$

$$\%ATI \text{ FI-C} = \frac{CPM (FI-C)}{CPM (FS-C) + CPM (FI-C)}$$

CPM: contagens por minuto; P: plasma; C: célula; FS-P: fração solúvel do plasma; FI-P: fração insolúvel do plasma; FS-C: fração solúvel da célula; FI-C: fração insolúvel da célula

2.4.5. Análise morfométrica

O esfregaço sangüíneo foi preparado com o sangue tratado como descrito no item 2.4.1, em lâmina (26x76 mm), após limpeza adequada, com o auxílio de uma outra lâmina também limpa formando um ângulo de 45°.

As lâminas foram colocadas sobre suporte e a técnica de coloração utilizada foi a May-Grünwald-Giensa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999) como descrito a seguir:

- distendimento com o corante May-Grünwald (Merck, Alemanha) por cinco minutos
- lavagem da lâmina com água destilada e posterior cobertura da mesma com o corante Giemsa (Merck, Alemanha) por dez minutos
- desprezo do corante seguido por mais uma lavagem com água destilada
- secagem da lâmina à temperatura ambiente em posição vertical.

Os esfregaços foram observados em microscópio óptico (Nikon) em objetiva de imersão (100x) com ocular fotográfica conectada a uma câmera de vídeo CCD Sony DXC-

151 A, cujas imagens foram enviadas para um computador equipado com “*frame grabber Matrix Vision*” para captura e processamento da imagem.

A quantificação dos dados foi realizada por meio do seguinte equipamento: “Software” Image Pro Plus (média Cibernetics), de acordo com os seguintes procedimentos: (a) captura de imagens em escala de cinza de 256 tons; (b) transformação da imagem da escala de cinza em binarizada, de acordo com a calibragem do limiar para destacar células sangüíneas. A contagem das células foi obtida através da função “*count/size*” do programa que permitiu contar objetos por tamanho, filtrar objetos pela relação entre o maior e o menor eixo, medir automaticamente a área, o perímetro e a esfericidade das células sangüíneas. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente.

2.4.6. Cultura bacteriana

Para a preparação de estoques glicerizados de *Escherichia coli* foram utilizados volumes iguais de cultura bacteriana, em fase estacionária, e glicerol estéril a 100%, sendo em seguida conservados em refrigerador a -20°C. Uma alíquota (50 µl) do estoque de *E. coli*, em glicerol, foi colocada em erlenmeyer estéril de 50 ml, contendo 5 ml de meio de cultura Miller's LB Agar estéril (Sigma Chemical Co., USA), o qual foi mantido a 37°C, em banho-maria com agitação, por 15 a 18 horas, período suficiente para a cultura atingir a fase estacionária de crescimento (cultura pernoite ou pré-cultura). Do pernoite foram obtidas as culturas para experimentos (cultura repique), transferindo-se 200 µl desta cultura para um erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml de meio de cultura LB, sendo este colocado em banho-maria com agitação a 37°C, por 2 horas, até ser atingida a fase exponencial ($1-2 \times 10^8$ células/ml).

Os 20 mL da cultura em fase exponencial foram distribuídos em 2 tubos para centrífuga, estéreis (10 ml em cada um). Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado (pellet) foram adicionados 10ml de NaCl 0,9% estéril e a solução final foi homogeneizada. Os tubos foram novamente colocados na centrífuga por mais 20 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (pellet) ressuspensão com 10 ml de NaCl 0,9% estéril, tendo sido agitado até que o pellet ficasse completamente dissolvido. O conteúdo de ambos os tubos foi colocado em um único tubo. Desta suspensão, foram retiradas alíquotas de 1,5 ml as quais foram distribuídas em tubos de ensaio com rosca e misturadas com o 50 μ L do extrato etanólico de *Curatella americana* nas concentrações de 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 0,5 mg/mL; e 50 μ L de NaCl 0,9% estéril como controle. Esse tubos foram incubados a 37°C, com agitação constante, por no máximo 60 minutos. Em intervalos de 20 minutos, alíquotas de 100 μ l foram retiradas e plaqueadas em meio de cultura Miller's LB Agar (Sigma Chemical Co., USA) gelosado com Bacteriological Agar (Sigma Chemical Co., USA) e, em seguida, distribuídas uniformemente com o auxílio de pérolas de vidro estéreis. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, ao abrigo da luz, por um período de \cong 18-24 horas. As UFC foram então contadas, tomando-se como valor em cada ponto, a média das duplicatas.

Uma vez obtido o número de sobreviventes em cada tempo de incubação, as frações de sobrevivência ($FS = N_t/N_0$) foram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis obtidas por mililitro, em cada tempo de tratamento (N_t), pelo número de células viáveis obtidas por mililitro no tempo zero (N_0). O gráfico foi obtido lançando-se no eixo das abcissas (x) (escala linear) os intervalos de tempo, e nas ordenadas (y) (escala logarítmica), as FS, obtendo-se desta forma a curva representativa da inativação da cepa bacteriana.

2.4.7. Análise estatística

Os experimentos foram repetidos e tiveram seus resultados expressos pela média aritmética \pm desvio padrão dos valores obtidos em cada experimento. Esses valores foram comparados empregando-se a análise de variância ANOVA seguido do pós-teste apropriado a cada experimento. Aceitou-se o nível de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.

3. Resultados

Os resultados obtidos da interferência da *C. americana*, em diferentes concentrações, sobre a marcação *in vitro* de hemácias, proteínas plasmáticas e celulares com Tc-99m estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Efeitos de diferentes concentrações de *C. americana* na marcação *in vitro* com Tc-99m em hemácias, proteínas plasmáticas e celulares.

Concentrações	C (%ATI)	FI-C (%ATI)	FI-P (%ATI)
Controle	97,0 ± 2,0	79,6 ± 2,9	72,5 ± 10,9
100%	49,3 ± 6,7 **	41,5 ± 8,8 *	70,6 ± 15,0
50%	48,9 ± 5,2 **	39,6 ± 16,6 *	75,8 ± 8,4
25%	44,2 ± 9,9 **	44,1 ± 12,1 *	80,9 ± 6,2
12,5%	48,1 ± 4,7 **	43,9 ± 12,7 *	66,9 ± 8,8
6,2%	35,3 ± 7,1 **	42,7 ± 8,7 *	79,2 ± 7,7
3,1%	37,3 ± 10,2 **	44,5 ± 1,7 *	69,1 ± 17,2
1,6%	34,1 ± 3,8 **	73,5 ± 7,3	75,5 ± 20,3
0,8%	41,2 ± 2,1 **	65,8 ± 8,1	79,9 ± 4,3

C (hemácias), FI-C (fração insolúvel das hemácias), FI-P (fração insolúvel do plasma). ANOVA – teste Dunnett. (**) p < 0,001; (*) p < 0,01 para n = 10

Os resultados mostram que houve diferença significativa (p < 0,001) na marcação *in vitro* das hemácias (C) entre o grupo controle (97,0 ± 2,00) e os grupos 100%; 50%; 25%; 12,5%, 6,2%, 3,1%, 1,6%, 0,8% (49,3 ± 6,7; 48,9 ± 5,2; 44,2 ± 9,9; 48,1 ± 4,7; 35,3 ± 7,1; 37,3 ± 10,2; 34,1 ± 3,8; 41,2 ± 2,1; respectivamente) indicando a interferência do extrato bruto de *C. americana* em diferentes concentrações diminuindo a marcação *in vitro* de hemácias com Tc-99m.

É possível observar ainda que o extrato, em maiores concentrações (100%; 50%; 25%; 12,5%, 6,2%, 3,1%), diminui significativamente ($p < 0,01$) a marcação *in vitro* das proteínas celulares (FI-C) ($41,5 \pm 8,8$; $39,6 \pm 16,6$; $44,1 \pm 12,1$; $43,9 \pm 12,7$; $42,7 \pm 8,7$; $44,5 \pm 1,7$; respectivamente). O mesmo efeito não foi observado na marcação das proteínas plasmáticas (FI-P) com Tc-99m.

O sangue retirado de animais tratados por cinco dias consecutivos com o extrato bruto de *C. americana*, na dose de 250 mg/Kg via oral, foi marcado com Tc-99m com a finalidade de avaliar a interferência do extrato na marcação de hemácias, proteínas celulares e plasmáticas após sua metabolização. Esses resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Interferência do extrato de *C. americana* após cinco dias de tratamento (250 mg/Kg) na marcação *in vivo/in vitro* com Tc-99m em hemácias, proteínas plasmáticas e celulares.

Grupos	C (%ATI)	FI-C (%ATI)	FI-P (%ATI)
Controle	$88,7 \pm 3,0$	$93,2 \pm 2,3$	$78,1 \pm 10,3$
<i>C. americana</i> (250 mg/Kg)	$68,2 \pm 14,1$ *	$91,6 \pm 3,3$	$58,1 \pm 8,3$ **

C (hemácias), FI-C (fração insolúvel das hemácias), FI-P (fração insolúvel do plasma). Teste Mann-Whitney
 (*) $p = 0,0286$; (**) $p = 0,0159$ para $n = 5$

Os resultados obtidos com o experimento de marcação *in vivo/in vitro* com Tc-99m mostram que mesmo depois de metabolizado o extrato ainda interfere significativamente ($88,7 \pm 3,0$; $68,2 \pm 14,1$; grupo controle e grupo tratado respectivamente, com $p = 0,0286$) sobre a marcação de hemácias (C) com o Tc-99m. Porém, após sua metabolização, o extrato passa a interferir de modo significante sobre as proteínas plasmáticas (FI-P), onde

ocorre uma queda da %ATI de $78,1 \pm 10,3$ (grupo controle) para $58,1 \pm 8,3$ (grupo tratado), e não mais com as proteínas celulares (FI-C), onde não há diferença significativa.

Na tabela 3 estão resumidos os resultados dos efeitos do extrato de *C. americana* (250 mg/Kg) na biodistribuição do pertecnetato de sódio em animais tratados durante cinco dias via oral.

Tabela 3. Efeito do extrato de *C. americana* (250 mg/Kg) na biodistribuição do Tc-99M após tratamento por cinco dias consecutivos (VO).

Órgãos	Controle (%ATI)	Tratado (%ATI)
Cérebro	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$
Tireóide	$1,3 \pm 0,1$	$2,4 \pm 1,5$
Coração	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Pulmão	$0,3 \pm 0,07$	$0,5 \pm 0,2^*$
Estômago	$1,5 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,5$
Pâncreas	$0,1 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,07^{**}$
Duodeno	$0,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2^*$
Rim	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
Baço	$0,2 \pm 0,06$	$0,3 \pm 0,1$
Fígado	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$
Femur	$0,2 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$
Músculo	$0,09 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,04^*$

Teste Mann-Whitney. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$

Foi possível verificar, através dos resultados da tabela 3, que houve um aumento significativo na fixação do radiofármaco estudado nos pulmões ($0,3 \pm 0,07$ e $0,5 \pm 0,2$), duodeno ($0,4 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,2$) e músculo ($0,09 \pm 0,02$ e $0,1 \pm 0,04$) controle e tratado, respectivamente, com $p < 0,05$, e no pâncreas ($0,1 \pm 0,03$ e $0,3 \pm 0,07$) controle e tratado,

respectivamente, com $p < 0,01$. Esses resultados indicam a interferência do extrato com os sistemas respiratório, digestório e muscular.

Para verificar o efeito citotóxico do extrato de *C. americana* em culturas bacterianas foi utilizada a cepa AB1157 (selvagem) de *E. coli*. Os resultados obtidos com este experimento estão apresentados no figura 2.

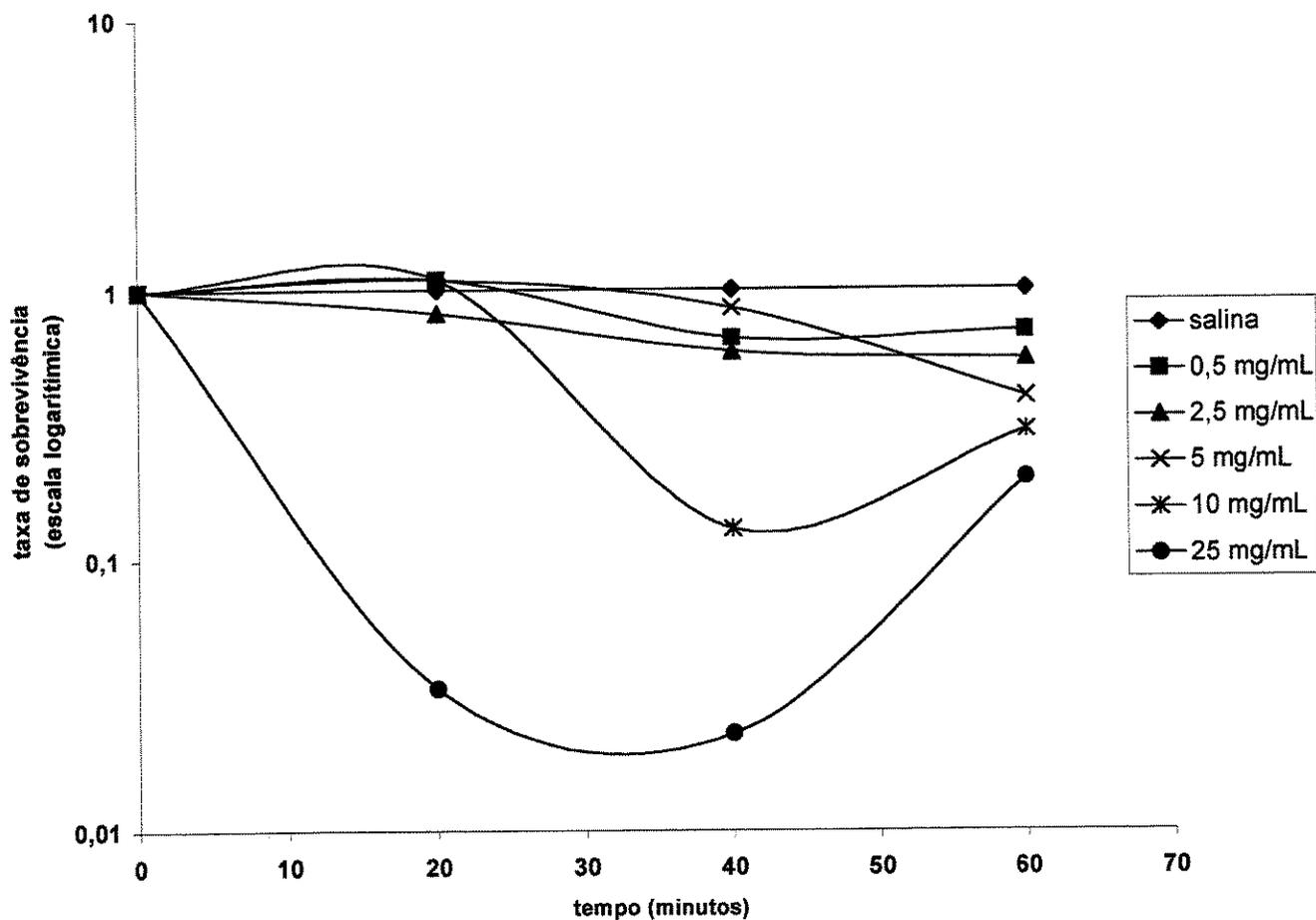


Figura 2. Curva de inativação de culturas de *E. coli* AB1157 tratadas com diferentes concentrações (mg/mL) do extrato de *C. americana*.

A curva de inativação, obtida a partir de culturas de *E. coli* AB 1157 tratadas com diferentes concentrações do extrato de *C. americana*, em tempos variados, mostra que o extrato diminui o crescimento das bactérias a partir de concentrações do extrato maiores que 10 mg/mL para o tempo de 20 minutos de incubação, de 5 mg/mL no tempo de 40

minutos e 0,5 mg/mL no tempo de 60 minutos. Tais resultados indicam uma baixa toxicidade *in vitro* do extrato, visto que tal toxicidade depende do tempo de incubação do mesmo com a bactéria.

A tabela 4 indica as alterações morfológicas (perímetro/área), comparando-se o controle com as diversas concentrações utilizadas do extrato. Esse estudo morfológico foi realizado por análise quantitativa das imagens mostradas na figura 3.

Tabela 4. Morfometria de hemácias (tratamento *in vitro*)

Concentração	Perímetro/Área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)
Controle	$0,9 \pm 0,2$
6,2%	$0,7 \pm 0,03^*$
12,5%	$0,7 \pm 0,05^*$
25%	$0,7 \pm 0,02^*$
50%	$0,6 \pm 0,05^*$
100%	$0,7 \pm 0,03^*$

ANOVA – teste Dunnet, (*) $p < 0,01$

É possível observar que, mesmo em pequenas concentrações, o extrato altera o formato da hemácia significativamente diminuindo a relação perímetro/área de $0,89 \pm 0,17$ (controle) para $0,67 \pm 0,03$; $0,67 \pm 0,05$; $0,68 \pm 0,02$; $0,65 \pm 0,05$; $0,71 \pm 0,03$ (6,25%; 12,5%; 25%, 50%, 100%, respectivamente). Esses resultados indicam que o extrato, de alguma forma, interfere na estrutura da hemácia.

As fotomicrografias de esfregaços de hemácias incubadas com diferentes concentrações do extrato mostram claramente a crenação das mesmas, confirmando os dados obtidos pela morfometria e, portanto, a interferência na estrutura da membrana destas células.

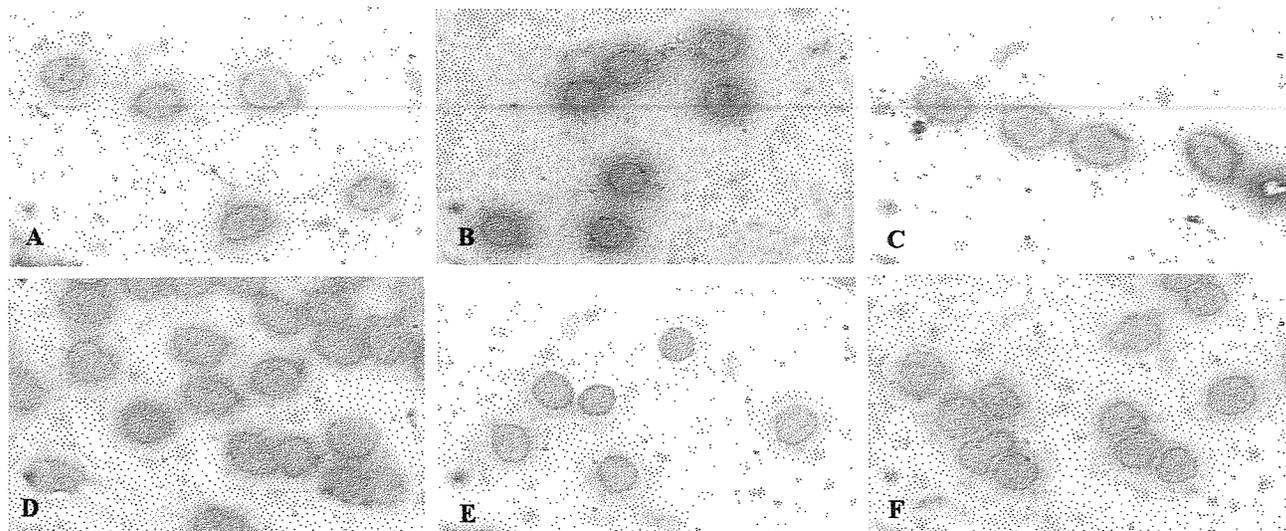


Figura 3. Fotomicrografia de esfregaços sangüíneos obtidos de amostra de sangue submetidas à marcação com Tc-99M onde, A: controle; e grupos tratados onde, B: 100%; C: 50%; D: 25%; E: 12,5%; F: 6,2%.

4. Discussão

O uso de produtos naturais vem crescendo ao longo dos anos. De modo geral, através da utilização desses produtos procura-se a cura para muitas doenças e paliativos de caráter menos tóxico. Logo, torna-se de extrema importância uma avaliação científica dos efeitos biológicos dos produtos de origem vegetal.

Tendo sido descrito que extratos vegetais podiam alterar a marcação de elementos sangüíneos com Tc-99m (VIDAL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000), decidiu-se avaliar a possibilidade do extrato etanólico de *C. americana* interferir com o processo. A marcação desses componentes sangüíneos com Tc-99m, como pertecnetato de sódio, depende da presença de um agente redutor e o cloreto estanoso é largamente empregado. A determinação da concentração ideal do cloreto estanoso é um fator preponderante na técnica de marcação (RAO et al., 1986; HLADIK III et al., 1987).

No caso das hemácias, essas captam o íon estanoso do meio extracelular. Quando a concentração deste íon é baixa, o mesmo é praticamente todo incorporado pelas hemácias. Assim, em concentração máxima deste agente redutor, as hemácias apresentam as mais altas porcentagens de marcação, possivelmente devido ao "preenchimento" máximo de sítios de ligação nas moléculas de hemoglobina. Depois do tratamento das hemácias com elevadas concentrações de cloreto estanoso o sistema que controla o fluxo deste íon satura-se e o mesmo não se mostra capaz de captar este íon de forma indefinida, o que provoca o aumento desse agente no meio extracelular. Ao ser adicionado, o Tc-99m, como íon pertecnetato, teria que atravessar essa barreira de agente redutor, o que impediria de alcançar as hemácias acarretando, desta forma, uma baixa eficiência de marcação (BERNARDO-FILHO, 1988).

O mecanismo de transporte destes íons para o meio intracelular ainda não foi totalmente esclarecido, mas há dados que sugerem que o cloreto estanoso atravessa a membrana plasmática pelos canais seletivos de cálcio (SAMPSON, 1996) e o íon pertecnetato pelo sistema de transporte “ânion banda-3” (CALLAHAN e RABITO, 1990; SAMPSON, 1996).

A presença de determinadas drogas no sangue poderia alterar a porcentagem de radioatividade do Tc-99m ligado aos elementos sangüíneos, pois estas poderiam atuar: (a) competindo com o cloreto estanoso ou com o Tc-99m; (b) alterando a permeabilidade da membrana celular favorecendo ou bloqueando o mecanismo de transporte destes elementos; (c) ocupando sítios de ligação do Tc-99m ou do cloreto estanoso; (d) favorecendo a ligação do Tc-99m às proteínas plasmáticas ou (e) como agente redutor ou oxidante modificando a valência dos íons estanoso e/ou pertecnetato (HLADICK III et al., 1987; SANTOS et al., 1995).

Da mesma maneira que outros vegetais como a *Thuya occidentalis* (OLIVEIRA et al., 1997), o fumo (VIDAL et al., 1998) e a *Maytenus ilicifolia* (OLIVEIRA et al., 2000), a *C. americana* alterou a eficiência de marcação das hemácias com Tc-99m. Quando o extrato foi administrado *in vitro*, além de diminuir consideravelmente a marcação nas hemácia, ele influenciou bastante também na ligação do Tc-99m com as proteínas celulares sem, contudo interferir na marcação das proteínas plasmáticas (tabela 1). Na marcação *in vivo/in vitro*, a interferência nas hemácias seguiu o mesmo comportamento da marcação *in vitro*, o que indica que os metabólitos do extrato conserva em parte as propriedades do extrato bruto. Porém, no tocante à interferência na marcação das frações insolúveis de plasma e hemácia, ocorre uma inversão, ou seja, no teste *in vivo/in vitro* houve diminuição na marcação das proteínas plasmáticas e não das celulares como na marcação *in vitro* (tabela 2). Este resultado pode indicar que, apesar dos metabólitos preservarem em parte

as propriedades do extrato bruto, há alguma modificação e estes metabólitos, de alguma maneira, favorecem a ligação do Tc-99m com as proteínas plasmáticas que, portanto, marca menos outras estruturas.

Estes resultados ainda possibilitam especular que a diminuição da marcação das hemácias, tanto *in vivo/in vitro* quanto *in vitro*, se deve ao fato do extrato causar alterações morfológicas nas hemácias (tabela 4), o que dificultaria o transporte de íons através da membrana ou ainda a ação quelante do mesmo, o qual quelaria o cloreto estanozo impossibilitando a redução do pertecnetato.

Uma vez que esses possíveis produtos de metabolização do extrato de *C. americana* também poderiam acarretar efeitos sobre a biodistribuição de radiofármacos, decidiu-se avaliar o efeito do tratamento *in vivo* na fixação do radiofármaco pertecnetato de sódio no animais tratados. Como já descrito para outras drogas (HLADIK III et al., 1987; MATOS et al., 2000), o extrato de *C. americana* foi capaz de modificar a biodistribuição do Tc-99m. Neste experimento houve aumento significativo da fixação de radioatividade no pulmão, pâncreas, duodeno e músculo (tabela 3). Isso revela possíveis efeitos que alteram a metabolização do pertecnetato de sódio nesses órgãos. Em relação à ação no pulmão e pâncreas, a medicina popular e estudos etnofarmacológicos (HIRUMA-LIMA, comunicação pessoal) revelam que a *C. americana* é utilizada contra tosse, bronquites, resfriados e diabetes, o que justificaria a alteração na captação do radiofármaco nos órgãos referidos acima.

A hemácia é uma das estruturas biológicas mais estudada. Sabe-se muito mais sobre a membrana da hemácia do que sobre qualquer outra membrana de células eucarióticas. A fácil disponibilidade e a simplicidade de armazenamento das hemácias, tornam-nas objeto ideal de pesquisa para quem possa lançar mão de um microscópio de boa qualidade (ALBERTS et al., 1996).

A forma normal das hemácias é apenas uma dentre as várias que elas podem assumir quando as condições se alteram. Deve-se, assim, considerar a forma como representando um equilíbrio entre as propriedades da célula e as forças físicas que agem sobre ela. Quando alguma dessas forças se alteram a forma se modifica prontamente e diferentes tipos de alterações podem ocorrer nas hemácias. O estudo destas formas pode contribuir como instrumento indispensável para o diagnóstico de diferentes patologias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

O principal método que revela os tipos celulares do sangue periférico é o de esfregaço sangüíneo. Este método difere dos métodos convencionais de preparação histológica, pois a amostra não é incluída em parafina. O estudo cuidadoso dos esfregaços de sangue fornece dados muito importantes. Pode-se afirmar que 90% das conclusões que se tiram do exame citológico são fornecidos pelo estudo dos esfregaços corados. Esta constitui, portanto, a melhor medida de estudo dos elementos morfológicos, além de fornecer uma idéia aproximada da concentração de hemoglobina e do número das hemácias, leucócitos e plaquetas (OLIVEIRA et al., 1992).

A modificação da morfologia da hemácia por extrato de planta medicinal (OLIVEIRA et al., 1997; VIDAL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000) e a possível alteração do transporte de íons estano e pertecnetato para o interior da hemácia poderia acarretar uma diminuição na marcação dessa estrutura com o Tc-99m.

A análise morfométrica das hemácias foi realizada a partir dos esfregaços sangüíneos feitas após o tratamento *in vitro* com diferentes concentrações do extrato (tabela 4). O resultado revelou que a relação perímetro/área dos grupos tratados é menor comparada à relação perímetro/área do grupo controle, caracterizando a alteração denominada crenação (figura 2).

Existem numerosas evidências que têm comprovado que a forma da célula depende da organização das proteínas estruturais da membrana e das proteínas adsorvidas à sua superfície (ALBERTS et al., 1996). Assim, pode-se sugerir que o extrato de *C. americana* possui a capacidade de alterar a morfologia das hemácias. Por outro lado, estudos com extrato de fumo (VIDAL et al., 1998) e *Maytenus ilicifolia* (OLIVEIRA et al., 2000) mostraram uma relação entre a alteração de marcação de hemácias com Tc-99m e modificações na morfologia das hemácias. Isso poderia justificar a diminuição da marcação de hemácias com o extrato, quando empregadas amostras de sangue de animais tratados com esse vegetal, onde também foi constatada alteração morfológica das hemácias (tabelas 1, 2 e 4).

Como já relatado anteriormente (item 1.7) o extrato etanólico de *C. americana* é rico em polifenóis (taninos), os quais estão bem distribuídas no reino vegetal e são encontrados em folhas, frutos e cascas de caule em concentrações que chegam a 50% do peso seco (HASLAM, 1989). Contribuem para a defesa da planta impedindo herbívoros de se alimentarem de tecidos vegetais ricos em tanino (HARBONE, 1998) e limitando o crescimento de patógenos e putrefação (MILA et al., 1996). Sua toxicidade entre os microorganismos é relativamente pequena, mas, quando presente em grandes concentrações, os polifenóis se tornam uma defesa com amplo espectro de ação. São considerados agentes de defesa por seus efeitos protetores contra predadores dependem da sua concentração nos tecidos vegetais (MILA et al., 1996; SCALBERT, 1992).

Seu papel na defesa vegetal é bem estabelecido, mas seu modo de ação não foi bem esclarecido ainda. Muitos autores sugeriram que os taninos inibem o crescimento de microorganismos formando complexos com enzimas ou proteínas nutrientes para os micróbios; porém, nenhuma prova esclarecedora foi dada até o momento (MILA et al., 1996). Foi proposto por SCALBERT (1991) que os polifenóis poderiam inibir o crescimento

de microorganismos por privação de ferro. O ferro está envolvido na ação de muitas enzimas e proteínas redox e é essencial para a maioria dos organismos vivos; entretanto, não é facilmente disponível já que ele forma hidróxidos insolúveis prontamente.

Polifenóis vegetais, com vários grupos *o*-diidroxifenil em suas estruturas, são também ótimos quelantes de vários íons metálicos, em particular ferro III com o qual formam complexos azul-preto largamente insolúvel em água (MILA et al., 1996), o que pode impedir a assimilação de ferro por microorganismos.

Tendo em vista a citotoxicidade mencionada anteriormente dos taninos, foi avaliado o efeito citotóxico do extrato etanólico de *Curatella americana*, o qual foi incubado com amostras de *E. coli* AB 1157, uma cepa selvagem. A diminuição na taxa de sobrevivência de *E. coli* indica uma citotoxicidade relativamente baixa do extrato, tendo em vista que a queda mais significativa ocorre em virtude do tempo e da concentração do extrato. Existe ainda a possibilidade deste efeito ser apenas citostático, ou seja, esse efeito não permite que as UFC se formem até trinta minutos de incubação com o extrato etanólico de *C. americana* nas concentrações de 10 mg/mL e 25 mg/mL.

Segundo MAKKAR et al. (1988), taninos condensados têm importância nutricional por ligar-se com proteínas e carboidratos além de reduzir a atividade de enzimas proteolíticas, ureolíticas e celulolítica de micróbios do rúmen e também as atividades fermentativas e multiplicação de suas células. Além disso, foi relatado por SALAWU et al. (1997) que os taninos condensados de quebracho (*Loxopterygium loetzi*) reduziu a atividade microbiana *in vitro*.

Portanto, a capacidade dos taninos de serem agentes quelantes de ferro e de ligação com enzimas e proteínas pode explicar a redução observada na taxa de sobrevivência de *E. coli*.

Ainda, justamente por apresentarem propriedades quelantes em relação ao ferro e se considerarmos que os potenciais de ionização do Sn II/Sn III e Fe II/ Fe III são muito próximos (30,498 eV/ mol e 30,643 eV/ mol, respectivamente) é possível inferir que no caso da marcação de elementos sanguíneos os taninos poderiam estar quelando o íons estanoso justificando, também, além da interferência com a membrana, a redução da fixação de Tc-99m nas hemácias.

5. Conclusões

A análise do conjunto de dados apresentados permite concluir que:

A marcação *in vitro* com Tc-99m de hemácias e proteínas plasmáticas e celulares de sangue incubado com preparações de *C. americana* foi alterada.

O extrato, ao ser administrado aos animais, alterou de forma significativa a eficiência de marcação com Tc-99m da fração insolúvel do plasma.

Em animais tratados com o extrato constatou-se alteração na captação do Tc-99m no pulmão, pâncreas, músculo e duodeno.

Foram observadas alterações morfológicas nas hemácias tratadas *in vitro* com o extrato, podendo justificar a redução na taxa de fixação do Tc-99m nas hemácias.

O extrato mostrou-se pouco citotóxico (citoestático) quando encubado com amostras de *E. coli* AB 1157 devido à taxa de sobrevivência do microorganismo ter se mostrado dependente do tempo de incubação e da concentração do extrato.

6. Referências bibliográficas

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D. **The cell in development and heredity**. New York: Garland Publishing, 1996. 1463p.
- ANDRADE, F. D. P. **Estudo químico de chás brasileiros**. Araraquara, 2002. (Tese – Doutorado, Universidade Estadual Paulista).
- BAUM, S. **Current practice in nuclear medicine**. California: Appleton & Lange, 1987. 225p.
- BERNARDO-FILHO, M.; MOURA, I.N.S.; BOASQUEVISQUE, E.M. ^{99m}Tc-99m-labeled red blood cells in vitro. **Arq Biol Technol**, 26 (4): 455-61, 1983.
- BERNARDO-FILHO, M. **Marcação de estruturas biológicas com Tc-99m**. Rio de Janeiro, 1988. (Tese – Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- BERNARDO-FILHO, M.; CUNHA, M.C.; VALSA, J.O.; ARAUJO, A.S. Evaluation of potencial genotoxicity of stannous chloride: inactivation, filamentation and lysogenic induction of *Escherichia coli*. **Food Chem Toxic**, 32 (5): 477-9, 1994.
- BERNARDO-FILHO, M. **Parâmetros físicos, químicos e biológicos associados à marcação de radiotraçadores com Tecnécio-99m**. Rio de Janeiro, 1999. (Tese – Professor Titular, Universidade Estadual do Rio de Janeiro).
- CALLAHAN, R.J.; FROELICH, J.W.; Mc KUSICK, K.A.; LEPPA, J.; STRAUSS, H.W. A modified method for the “in vivo” labeling of red blood cells with Tc-99m: concise communications. **J Nucl Med**, 23: 315-18, 1982.
- CALLAHAN, R.J.; RABITO, C.A. Radiolabeling of erythrocytes with technetium-99m: role of band-3 protein in the transport of pertecnetato across the cell membrane. **J Nucl Med**, 31: 2004-10, 1990.

- DANTAS, F. J. S.; MORAES, M. O.; CARVALHO, E. F.; VALSA, J. O.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB 1157: Participation of reactive oxygen species. **Food Chem Toxicol.** 34: 959-62, 1996.
- DEWANJEE, M.K. The chemistry of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals. **Sem Nucl Med**, 1: 5-27, 1990.
- DEWANJEE, M; K.; RAO, S. A.; PENNISTON, J. T. Mechanism of red blood cell labeling with ^{99m}Tc Technetium pertechnetate and the role of cation pumps at RBC membrane on distribution and binding of Sn^{2+} and ^{99m}Tc Technetium with membrane proteins and hemoglobin. **J Labelled Comp Rad**, 11:1464-66, 1982.
- DIEHL, K.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J.; de VORSTENBOSCH, C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **J App Toxicol**, 21: 15-23, 2001.
- EARLY, P.J.; SODEE, D.B. **Principles and practice of nuclear medicine**. 2 ed. St. Louis: Mosby, 1995. 887p.
- EISING, E. G.; REINERS, C. Influences on evaluability of radionuclide ventriculography in chemotherapy. **Nucl Med Commun**, 19: 241-50, 1998.
- FEITOSA, S. B; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W; ALMEIDA, A. B. DE; PAULA, A. C. B; et al. Atividade antiulcerogênica da *Curatella americana* L. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, XVI, 2000, Recife, p 255.
- FREITAS, R. S.; GUTFILEN, B.; BARBOSA da FONSECA, L. M.; BERNARDO-FILHO, M. Evaluation of technetium 99m radiopharmaceutical binding to blood elements using different trichloroacetic acid concentrations. **J Biol Med**, 5:483-8, 1996.
- GARCIA, E. A. C. **Biofísica**, São Paulo: Savier., 2000. 387p.

- HARBER, J.C.; ECKELMAN, W.C.; NEWMANN, R.D. **Nuclear medicine diagnosis and therapy**. New York: Thieme, 1996. 230p.
- HARBONE, J. B. **The flavonoids**: Advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1993. 676p.
- HARBONE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 3 ed. London: Chapman and Hall, 1998. 302p.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols**: Vegetables tannins revisited. Cambridge: Cambridge University Press. 581p.
- HICKS, R. J.; ARKLES, L. B. Efficiency of labeling of red blood cells with technetium-99m after dipyridamole infusion for thallium-201 stress testing. **Eur J Nucl Med**, 19: 1050-3, 1992.
- HLADICK III, W. B.; SAHA, G. B.; STUDY, K. T. **Essentials of Nuclear Medicine Science**. Baltimore-London: Williams and Wilkins, 1987.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- KNAPP, F. F. Jr.; MERZADETH, S. The counting important role of radionuclide generator system for nuclear medicine. *Eur. J. Nucl. Med.* 21:35-38, 1994.
- LEWIS, D. A.; HANSON, P. J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: ELLIS, G. P. AND WEST, G. B. **Progress in Medicinal Chemistry**. New York: Elsevier Science Publishers, 1991. Cap 4, p. 201-231.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. São Paulo: Plantarum, 2002. Volume 1. 352p.
- MAKKAR, H. P. S.; SINGH, B; DAWRA, R. K.; Effect of tannin rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzymes activities of bovine rumen. **Br J Nutr**. 60: 287-96, 1988.

- MATOS, H. R.; Di MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. **Arch Biochem Biophys**, 383 (1): 56-9, 2000.
- MILA, I.; SCLABERT, A.; EXPERT, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. **Phytochemistry**, 42 (6): 1551-5, 1996.
- NEIDHARDT, F. C.; MOSELIO, S. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: Neidhart, F. C. **Escherichia coli and Salmonella typhimurium**. Washington: American Society of Microbiology, 1987. 1-2.
- OLIVEIRA, J. F.; BRAGA, A. C.; OLIVEIRA, M. B.; AVILA, A. S.; CALDEIRA-de-ARAÚJO, A.; CARDOSO, V. N.; et al. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **J Ethnopharmacol.**, 72 (1-2): 179-84, 2000.
- OLIVEIRA, J. F.; BRAGA, A. C.; AVILA, A. S., FONSECA, L. M., GUTFILEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of *Thuya occidentalis* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with Technetium-99m. **Yale J Biol Med**. 69 (6): 489-94, 1996.
- OLIVERIA, J. R.; EMEDIATO, L. G.; CYBULSKA, E. M.; RIBAS, R. V.; SEALE, W. A.; RAO, M. N. et al. Semidecoupled band structure in odd-odd ¹³⁴La and ¹³⁶Pr. **Phys Rev C Nucl Phys**. 45 (6): 2740-5, 1992.
- OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S.; JAHAN, S. A miniaturized rapid paper chromatographic procedure for quality control of technetium-99m sestamibi. **Eur J Nucl Med**, 22(12):1416-9, 1995.
- PERKINS, A. C.; FRIER, M. Bad blood and biologics: The need for new radiopharmaceutical source materials. **Nucl Med Commun**, 71 (1): 7-14, 1999.

- RAO, S. A.; KNOBEL, J.; COLLIER, B. D.; ISITMAN A. T. Effect of Sn (II) ion concentration and heparin on technetium-99m red blood cell labeling. **J Nucl Med**, 27 (7): 1202-6, 1986.
- REININGER, R.; SAILE, V. V.; LAPORTE, P. Photoionization yield spectra below the atomic ionization limit in xenon. **Phys Rev Lett**, 54 (11): 1146-9, 1998.
- SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**, 4^a ed., New York: Springer-Verlag, 1998. 358p.
- SALAWU, M. B.; ACAMOVIC, T.; STEWART, C. S.; HOVELL, F. D. De B. Quebracho tannins or without Browse Plus (a commercial preparation of polyethylene glycol) in sheep diets: effect on digestibility of nutrients in vivo and degradation of grass hay in sacco and in vitro. **An Feed Technol**. 69: 67-78, 1997.
- SAMPSON, C. B. Stress and pressure in the radiopharmacy: a cause for concern. **Nucl Med Commun**, 17 (10): 831-3, 1996.
- SANTOS, J. S.; de-PAULA, E. F.; CORREA, T. G.; de-FREITAS, L. C.; da-FONSECA, L. M.; GUTFILEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of cyclophosphamide on the binding of ^{99m}TcO₄ and ^{99m}Tc-MDP to blood cells and plasma proteins. **Braz J Med Biol Res**, 28 (1): 131-5, 1995.
- SCALBERT, A. **Plant polyphenols: biogenesis, chemical properties and significance**. New York: Plenum Press, 1992.
- SCHATZMANN, H. J. Asymmetry of the magnesium sodium exchange across the human red cell membrane. **Biochim Biophys Acta**, 1148 (1): 15-8, 1993.
- SILVA, C. R.; VALSA, J. O.; CANINE, M. S.; CALDEIRA-de-ARAUJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Evaluation of technetium-99m decay on *Escherichia coli* inactivation: effects of physical or chemical agents. **Yale J Biol Med**, 71 (1): 7-14, 1998.

- SIMÕES, S. B. E. **Marcação de fenobarbital de sódio com Tc-99m e biodistribuição em *Mus musculus* Linnaeus infectados por *Schistosoma mansoni* Sabom.** Rio de Janeiro, 1996. (Monografia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro).
- SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C.; PURDON, A. D.; MAUCO, G. Regulation of platelet phospholipid metabolism. **Adv Exp Med Biol**, 192: 281-91, 1985.
- SRIVASTAVA, S.C. Is there life technetium: what is the potencial for developing new broad-based radionuclides. **Semin Nucl Med**, 2: 119-131, 1996.
- SRIVASTAVA, S.C.; STRAUB, R.F. Blood cell labeling with ^{99m}Tc: progress and perspectives. **Semin Nucl Med**, 1: 41-51, 1990.
- THOMPSON, S.; NEWMAN, P.; MADDY, A. H. An examination of the labeling of intact human erythrocytes with Tc-99m. **Br J Haematol**, 49: 575-580, 1981.
- VIDAL M. V.; GUTFILEN, B.; da FONSECA, L. M.; BERNARDO-FILHO, M. Influence of tobacco on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **J Exp Clin Cancer Res**, 17 (1): 41-6, 1998.