



AÇÃO RADIOPROTETORA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA DE *Anadenanthera colubrina* SOBRE OS EMBRIÕES DE *Biomphalaria glabrata*

José Luís. F. Sá^{1,2}, Williams Nascimento Siqueira¹, Hianna Arely M. F. Silva.^{1,2}, Larissa S. A. Melo, Isabelle Cristinne F. Bezerra³, Maíra V. Lima, Dewison R. Pereira¹, Luiz Alberto L. Soares³, Márcia V. Silva², Maria Tereza S. Correia², Ana Maria M. A. Melo.¹

1- Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CB – UFPE

2- Departamento de Bioquímica, CB – UFPE.

3- Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS– UFPE.

luismuma6@gmail.com

INTRODUÇÃO

Radiação é energia que se propaga a partir de uma fonte emissora através de meio material ou vácuo, podendo ser classificada como radiação ionizante e não ionizantes (Santos et al., 2013; Okuno, 2013; Siqueira et al., 2014). A radiação ionizante é caracterizada por apresentar energia suficiente para remover elétrons de um átomo, ocasionando a ionização do mesmo. As radiações não ionizantes, por sua vez, interagem com os elétrons dos átomos ocasionando excitação dos mesmos. As radiações ionizantes são representadas pelas partículas alfa(α), beta(β), prótons, nêutrons, raios gama(γ) e raios X. São exemplos de radiações não ionizantes os raios ultravioletas, infravermelho, as ondas de radiofrequência, o laser e a luz visível (Bitelli, 2006; Siqueira et al., 2014).

As radiações ionizantes, quando em contato com o sistema biológico podem ocasionar danos ao DNA. Estes tipos de energias possuem a capacidade de modificar a fita de DNA gerando erros na divisão celular, podendo ocasionar mutações e até mesmo morte do organismo (Dowd; Tilson, 1999; Santos et al., 2013; Siqueira et al., 2014). Essa interação pode ocorrer de forma direta, quando a radiação age diretamente sobre a biomolécula. Indiretamente a radiação interage sobre molécula de água, produzindo radicais livres que vão agir sobre as biomoléculas alvo (Santos et al., 2013; Siqueira et al., 2014).

Na literatura há vários relatos de estudos sobre os modelos experimentais para dimensionar os efeitos danosos ocasionados pela radiação nos sistemas biológicos. Como exemplo podem ser citados, bactérias, cultura de células, peixes, concha de moluscos, embriões de *Biomphalaria glabrata*, fantasmas de hemácias e cultura de linfócitos (Siqueira et al., 2014). De acordo com os estudos, o modelo experimental, utilizando os moluscos de *B. glabrata* e suas proles (embriões) tem fornecido resultados excelentes na avaliação dos efeitos da radiação nos sistemas biológicos, por terem os seguintes aspectos: curto ciclo de vida, fácil manutenção em laboratório, baixo custo de manutenção, boa reprodutibilidade e resposta rápida e precisa (Mello et al., 1996; Siqueira et al., 2014).

A aplicação da radiação em diferentes áreas de atuação humanas como: na medicina, agricultura, indústria tem levantado a necessidade de desenvolver substâncias capazes de proteger o sistema biológico de trabalhadores da área. Estas substâncias são denominadas de radioprotetores, compostos que possuem a propriedade de proteger o tecido vivo, diminuindo os danos a ele

causados pela radiação. Sua ação é resultado da interação química entre esses compostos e as espécies reativas do oxigênio geradas pela radiação, impossibilitando os efeitos danosos. Os radioprotetores podem ser classificados como sintéticos e naturais (Santos et al., 2013; Siqueira et al., 2014). Segundo os estudos realizados, os sintéticos têm mostrados ação protetora contra os efeitos nocivos causados pela radiação, porém, esses radioprotetores possuem efeitos colaterais como náusea, vômito e hipotensão (Listet al., 1996; Santos et al., 2013). Desta forma o interesse em pesquisar radioprotetores de origem natural tem aumentado consideravelmente. (Tung-kwanget al., 2010).

Dentre os diferentes vegetais podemos citar a *Anadenanthera colubrina*, planta da caatinga pertence à família Fabaceae, popularmente conhecida por angico, sendo utilizada no combate a diferentes enfermidades como: gonorreia, leucorreia, no tratamento de febres, úlcera asma e diarreia (Rodrigues et al., 2005; Lima et al., 2014), tendo propriedades químicas indicativas de ser bom radioprotetor frente aos efeitos nocivos ocasionados pela radiação.

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar ação radioprotetora da casca de *Anadenanthera colubrina* sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e armazenamento da planta *Anadenanthera Colubrina*:

Amostras de *A. colubrina* casca, foram coletadas em fragmento de caatinga dentro da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). A área está localizada na cidade de Caruaru, região Agreste do estado de Pernambuco, Brasil (08°14'18.2"S e 35° 54'57.1"W). Um espécime foi depositado no herbário professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco, número de registro 48663.

Obtenção do extrato da planta *Anadenanthera Colubrina*:

Após a coleta as amostras foram submetidas à secagem em sombra e ambiente ventilado, em seguida foi triturado em moinhos de faca e peneiradas em uma peneira de malha de 2,0 x 2,0 mm. O extrato bruto da casca de *A. colubrina* (angico) foi obtido pelo método de maceração a partir de 5 g de massa vegetal em 100 ml de metanol a 80%, a solução foi mantida por 72 horas protegida da luz. O extrato foi seco em rota-evaporador (Fisaton modelo 803) à pressão reduzida. A rota-evaporação do extrato é feita para retirada total do solvente metanol a 80% e a água.

Prospecções fitoquímico das principais classes de metabólitos secundários de *Anadenanthera Colubrina*:

Para as análises por CCD foram utilizadas placas de alumínio de sílica gel 60 F254 Merck® de tamanho de 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorção. O método empregado na identificação das principais classes de metabólitos secundários (taninos, flavonoides, açúcares, saponinas, esteroides e terpenoides) foi estabelecido por Wagner e Bladt (1996).

Embriotoxicidade

Os embriões da espécie *B. glabrata*- pigmentados foram obtidos do moluscário do departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE, por meio do método de KAWANO et al., 1992. Os embriões coletados foram analisados quanto à viabilidade, separados em grupos e exposto ao extrato bruto da casca de *A. colubrina* nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm. Controle negativo (água e DMSO a 0,5%) e controle positivo Niclosamida (Bayluscide, Bayer), 1 µg/mL. Cada grupo foi composto por aproximadamente 100 embriões, após a exposição de 24 horas os parâmetros analisados são: frequência de viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). O experimento foi realizado em triplicata.

Embriotoxicidade e teste de efeito radioprotetor do extrato bruto da casca de *A. colubrina*

Foram utilizados aproximadamente 1144 embriões da espécie *B. glabrata*-pigmentados. Os embriões foram obtidos do moluscário do departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Com o objetivo de facilitar a coleta das desovas dos moluscos foram colocadas tiras de polietileno incolor de aproximadamente 5x5 cm, sobre a superfície da água dos aquários criadouros por um período de 24 horas. Após a coleta das desovas, os embriões foram analisados quanto à viabilidade e em seguida separados em grupos com aproximadamente 100 espécimes formados da seguinte forma: grupo controle negativo com água filtrada, grupo controle com água e submetidos à irradiação, grupo controle com extrato de angico não irradiado na concentração de 125 ppm (A concentração escolhida através dos testes previamente, realizados em nosso laboratório, dados não publicado) e grupo exposto ao extrato de angico e irradiados com 4,0 Gy. Para a exposição a radiação foi utilizado o irradiador gammacell de ⁶⁰Co (modelo 220-Excel MDS Nordion) do Departamento de Energia Nuclear (DEN-CTG) da Universidade Federal de Pernambuco.

Para análise dos embriões expostos aos extratos foi utilizado um microscópio estereoscópico (Tecnival-SQZ). A avaliação dos efeitos foi realizada por meio da metodologia padronizada por Okazaki et al., 1996.

Análises estatístico

Os resultados foram avaliados com auxílio do programa prism 5.0 por meio do teste estatístico de ANOVA e Tukey com p < 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil fitoquímico do extrato bruto da casca de *A. colubrina* pode ser observado na (Tabela 1). Na avaliação fitoquímica, as placas cromatográficas indicaram a presença dos seguintes metabólitos: Taninos, açúcares e fenóis. Estudos de análise de perfil fitoquímico da casca de *A. colubrina* já realizados mostram a presença de esteróides, flavonóides, triterpenóides, componentes fenólicos e também são ricos em taninos (Lorenzi; Matos, 2002; Colacite, 2015). Segundo a literatura os flavonóides e compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante (Leite et al., 2001; Haslam, 1996).

Tabela 1. Perfil fitoquímico do extrato bruto da casca de *A. colubrina* pelo método de

Metabólitos secundários					
Esteróides	Flavonóides	Taninos	Açúcares	Terpenóides	Fenóis
-	-	+	+	-	+

CCD.

Na tabela 2, pode-se observar os resultados dos embriões expostos ao extrato bruto da casca de *A. colubrina* por 24 horas e observados por oito dias. Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar previamente, a toxicidade do extrato da casca de angico em diferentes concentrações (125, 250, 500 e 1000) e também para facilitar a escolha da concentração menos tóxica e que posteriormente, foi utilizada para realizar o teste radioprotetor da casca de angico. Na avaliação do teste com embriões, as concentrações de 125, 250 e 500, foram menos tóxicas aos embriões de *B. glabrata* exibindo uma frequência de mortalidade de 1,7; 2 e 10,4%. Porém, a concentração de 1000 ppm apresentou uma frequência de mortalidades dos embriões de 100%. Por tanto, a concentração de 125 ppm foi escolhido para realizar o teste radioprotetor por exibir menos toxicidade aos embriões de *B. glabrata* em relação aos restantes das concentrações utilizadas no teste.

Tabela 2. Resultados dos embriões de *B. glabrata* expostos ao extrato bruto da casca de *A. colubrina* por 24 horas.

[] Ppm	Total de Embriões	Inviáveis Total	%	Viáveis total	%
0	294	13	4.5	281	95.6
NCL	300	300	100	0	0
125	292	5	1.7	287	98.3
250	295	6	2	289	98.0
500	300	31	10.4	269	89.6
1000	312	312	100	0,0	0.0

Os dados em que p < 0,05 demonstram diferenças significativas entre os grupos, * vs. C. Onde, C - controle e NCL - niclosamida.

Na figura 1, ilustra os resultados dos embriões de *B. glabrata* expostos a radiação de gama de ⁶⁰Co utilizando a dose de 4,0 Gy, na presença dos extratos bruto da casca de *A. colubrina* na concentração de 125 ppm. Os testes realizados para analisar os efeitos radioprotetores do extrato bruto de *A. colubrina* mostraram que o grupo irradiados na presença de extrato bruto de angico na concentração de 125 ppm, não apresentou diferenças estatisticamente significativo quando comparados aos grupos controle irradiado na dose de 4,0 Gy, não irradiados e grupos expostos apenas com extrato bruto de angico, ou seja, todos grupos exibiram uma baixa frequência de números de embriões malformados ou mortos (Figura 1). E com relação ao grupo irradiados na presença de extrato bruto de angico na concentração de 125 ppm apresentou uma diminuição no número de embriões inviáveis (13%) quando comparados apenas com o grupo controle irradiado na dose de 4,0 Gy (15%) (Figura 1). Essa diminuição na taxa de inviabilidade pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos e de taninos no extrato bruto da casca de angico.

Estudos realizados com o extrato metanólico da casca de *Caesalpinia pyramidalis* sobre os embriões de *B. glabrata* mostrou que grupos irradiados com doses de 2,5 e 4,0 Gy, na presença do extrato na concentração de 250 ppm, não apresentaram diferença

significativas no número de embriões inviáveis quando comparados a seu controle não irradiado, respectivamente (Santos et al., 2013). Este estudo corrobora com os resultados encontrados no nosso trabalho.

Siqueira et al., 2014, analisou o efeito radioprotetor do extrato aquoso da casca e folha de *Ziziphus joazeiro* irradiados com 2,5 e 5,0 Gy e demonstrou que todos os grupos apresentaram um baixo percentual de embriões malformados ou mortos. E que o grupo irradiado com 5,0 Gy na presença de extrato aquoso da folha exibiu um menor número de embriões inviáveis quando comparados com o grupo controle irradiado também com 5,0 Gy. E o grupo irradiado com 5,0 Gy na presença do extrato aquoso da casca, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle irradiado (5,0 Gy). E que a ação radioprotetor do extrato da folha de *Z. joazeiro* podem estar relacionada a presença dos metabolitos secundários com potencial antioxidante.

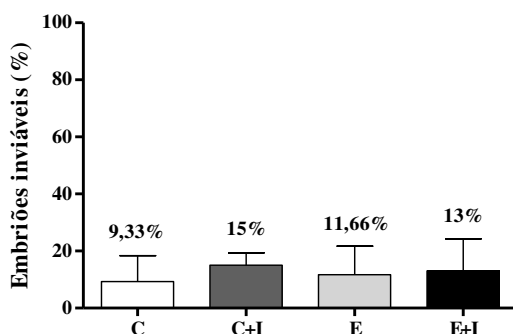


Figura 1: Ensaio realizado com embriões de *Biomphalaria glabrata* em presença do extrato bruto da casca de *A. colubrina*, na concentração de 125 ppm, submetidos às radiações de 4,0. As letras presentes no eixo x representam os grupos: controle (C), controle irradiado na presença da água (C+I), extrato bruto na concentração de 125 ppm (E), extrato bruto da casca irradiado a 4,0 Gy (E+I). Os dados foram expressos \pm E.P.M. (Erro padrão da média), p (Nível de significância) < 0,05, nos quais os embriões submetidos ao extrato da casca da catingueira não mostraram * (Diferença significativa) em relação ao controle.

CONCLUSÕES

A análise fitoquímica do extrato bruto da casca de angico mostrou a presença de taninos, açúcares e fenóis. E os resultados obtidos da exposição dos embriões de *B. glabrata* a radiação na presença do extrato da casca de *A. colubrina* na concentração de 125 ppm apresentou uma leve atividade radioprotetora. Sugere-se um estudo mais detalhado sobre a parte química da planta em relação ao enriquecimento da casca de *A. colubrina* (concentração dos metabolitos responsáveis pela atividade antioxidante) com o objetivo de potencializar a ação radioprotetora.

REFERÊNCIAS

- BITELLI T. Física e dosimetria das radiações, São Paulo: Atheneu; c. 442 p. 5, 2006.
- COLACITE, J. Triagem Fitoquímica, Análise Antimicrobiana e Citotóxica e dos Extratos das Plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanedae*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Saúde e Pesquisa*, 8(3), 509-516, 2015.
- DOWD S. B., TILSON E. R. Practical radiation protection and applied radiobiology, Philadelphia: Saunders Company, c1999.
- Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal Natural Products*. 59(2):205-215, 1996.
- LEITE J. P., RASTRELLI L., ROMUSSI G. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian

beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8):3796-3801, 2001.

LIST, A. F.; HESTON, R.; GLINSMANN-GIBSON, B.; CAPIZZI, R. L. Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors cytotoxicity. *Seminars in Oncology*, v. 23, n. 4, p. 58-63, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, J. F. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MELO A. M. M. A.; OKAZAKI K, KAWANO T. Study of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos. *Journal of Medical and Applied Malacology*. 8:140-141, 1996.

OKAZAKI K, ANDRADE HF, KAWANO T. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.; 29:1057-1067, 1996.

OLIVEIRA S. M. L., SIQUEIRA, W. N., SÁ, J. L. F., SILVA, L. R. S., DE VASCONCELOS C., D. L., AMÂNCIO, F. F., ALBUQUERQUE M., A. M. M. Estudo do efeito radioprotetor do extrato metanólico de *Caesalpinia pyramidalis* sobre células embrionárias de *Biomphalaria glabrata*. *Scientia Plena*, 9(9), 2013.

SIQUEIRA, W. N., SILVA, L. R. S., OLIVEIRA S., M. L., SANTOS, F. T. J., SILVA, H. A. M. F., LACERDA, L. B. N., ...ALBUQUERQUE M. A. M. M. Efeito radioprotetor do extrato de *Ziziphus joazeiro* sobre embriões de *Biomphalaria glabrata* submetidos à radiação ionizante. *Scientia Plena*, 10(9), 2014.

TUNG-KWANG L., O'BRIEN K. F., WANG W., JOHNKE R. M., SHENG C, BENHABIB S. M., WANG T., ALLISON R. R. Radioprotective Effect of American Ginseng on Human Lymphocytes at 90 Minutes Post irradiation: A Study of 40 Cases. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 16(5):561-567, 2010.

RODRIGUES, A. C. DA C.; OSUNA, J. T. A. mudanças morfológica em sementes na espécie Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan Var. cebil [Griseb] Altschul) em diferentes condições ambientais. Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia 2005.