

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA NUCLEAR**

FAGNER CHAGAS ROTHER

**USO DO SUCO DE UVA (*Vitis labrusca*) COMO POTENCIAL
RADIOMODIFICADOR NATURAL SOBRE INDICADORES DA
SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO**

**Rio de Janeiro
2014**

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

FAGNER CHAGAS ROTHER

**USO DO SUCO DE UVA (*Vitis labrusca*) COMO
POTENCIALRADIOMODIFICADOR NATURAL SOBRE INDICADORES
DA SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Engenharia Nuclear,

Orientador: Pesq. Edson Ramos de Andrade - D.Sc.

**Rio de Janeiro
2014**

c 2014

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha.

Rio de Janeiro - RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, micro-filmar ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e do orientador.

539.77 Rother, Fagner Chagas
R846u Uso do suco de uva *Vitis labrusca* como potencial
radiomodificador natural sobre indicadores da síndrome aguda da
radiação/ Fagner Chagas Rother; orientado por Edson R.Andrade.
- Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2014.
74p.: il.
Dissertação (mestrado) - Instituto Militar de Engenharia. – Rio
de Janeiro, 2013.
1. Engenharia Nuclear – teses e dissertações. 2. Controle
Ambiental 3.Radiação Ionizante. 4. Radiação. I.Andrade, Edson
Ramos II. Título. III. Instituto Militar de Engenharia.

CDD 539.77

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

FAGNER CHAGAS ROTHER

**USO DO SUCO DE UVA (*Vitis labrusca*) COMO POTENCIAL
RADIOMODIFICADOR NATURAL SOBRE INDICADORES DA
SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Engenharia Nuclear,

Orientador: Pesq. Edson Ramos de Andrade - D.Sc.

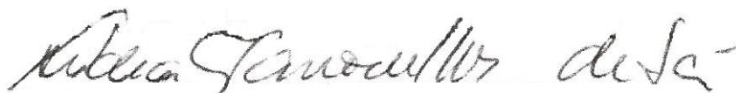
Aprovada em 30 de janeiro de 2014 pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Edson Ramos de Andrade – D.Sc. do IME - Presidente



Prof. Wilson Freitas Rebello da Silva Junior – D.Sc. da UERJ



Pesq. Lidia Vasconcellos de Sá - D.Sc. do IRD



Pesq. Hélio de Carvalho Vital – PhD. do CTEx

**Rio de Janeiro
2014**

Ao meu pai Heraclides Nery Rother por ter me ensinado o valor da honra, companheirismo e a lutar pelos meus objetivos. Obrigado por tudo.

Deus te acompanhe!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e pela saúde.

Agradeço carinhosamente aos meus pais, Heraclides e Claudia Rother, e meus irmãos Jessica e Mario Rother, pelo amor incondicional, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo apoio em todas os momentos da minha vida.

À minha namorada e grande amiga Michele Hinerasky, pelo apoio e dedicação em todos os momentos, em especial nesta conquista. Pelas idéias, orientações e sugestões que tornaram possível a realização deste trabalho. Pelos ensinamentos durante as análises bioquímicas e principalmente pela paciência. Sem esquecer é claro, pelo amor e por me fazer muito feliz. Obrigado Michele!

Ao IME, por permitir e incentivar esta pesquisa, cujo caráter multidisciplinar envolvia trabalhos em outras áreas.

Ao departamento de fisiologia da UFSM, em nome da Professora Dr. Liliane Bauermann, pela disponibilidade, incentivo e pelas análises fisiológicas e bioquímicas realizadas neste trabalho.

E finalmente a meu orientador e amigo Dr. Edson Ramos de Andrade, pela paciência e disposição em me orientar, não importando a hora nem a localização geográfica, e acima de tudo por ter me despertado o gosto pela física, quando eu ainda estava no ensino médio. E hoje, 10 anos depois, continua me ensinando o que é ser um verdadeiro cientista. Obrigado!

“Que estranha é a sina que cabe a nós mortais! Cada um de nós está aqui para uma temporada; com que propósito não se sabe [...] Os ideais que tem iluminado meu caminho, e repetidamente me tem renovado a coragem para enfrentar a vida com ânimo, são a Bondade, a Beleza e a Verdade [...] O único homem que está isento de erros é aquele que não arrisca acertar”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 Radiações ionizantes.....	14
1.2 Interação da Radiação com a Matéria.....	19
1.2.1 Efeito Fotoelétrico.....	20
1.2.2 Espalhamento Compton.....	21
1.2.3 Produção de Pares.....	22
1.3 Dosimetria das Radiações Ionizantes.....	23
1.3.1 Dose Absorvida.....	24
1.3.2 Dose equivalente.....	24
1.4 Contaminação e Exposição.....	26
1.5 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes.....	27
1.5.1 Síndrome Aguda da Radiação.....	31
1.6 Subprodutos da Uva como Potenciais Radiomodificadores.....	32
1.7 Estresse oxidativo e defesa antioxidante.....	34
2.0 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Delineamento geral.....	39
3.2 Condições gerais de manutenção dos animais	39
3.3 Condições gerais de tratamento	40

3.4	Caracterização bromatológica e química do suco de uva	40
3.5	Condições de exposição à radiação gama	41
3.6	Procedimentos experimentais	41
3.7	Análises fisiológicas, hematológicas e bioquímicas	42
3.8	Análise dos Dados	43
4.0	DISCUSSÃO E RESULTADOS	44
4.1	Enzimas do sangue.....	44
4.2	Parâmetros Hematológicos.....	49
4.3	Metabolismo.....	53
4.4	Sistema Antioxidante.....	56
5.0	CONCLUSÃO	60
6.0	REFERÊNCIAS	61
7.0	ANEXO (Protocolos e Métodos Utilizados)	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG.1.1 Espectro eletromagnético.....	14
FIG.1.2 Representação da emissão da radiação gama pelo núcleo.....	15
FIG.1.3 Representação da emissão da radiação de frenamento.....	16
FIG.1.4 Esquema geral de classificação das radiações ionizantes e não ionizantes.....	19
FIG.1.5 Representação geométrica do conceito de secção de choque diferencial.....	20
FIG. 1.6 Ilustração do efeito fotoelétrico.....	21
FIG. 1.7 Ilustração do espalhamento Compton.....	22
FIG.1.8 Relação dos processos de interação em função da energia	23
FIG. 1.9 Dano radioinduzido ao DNA.....	28
FIG. 1.10 Possíveis vias de exposição.....	30
FIG. 1.11 Efeitos imediatos da radiação de corpo inteiro.....	32
FIG. 1.12 Antioxidante neutralizando um radical livre.....	33
FIG. 4.1 Parâmetros enzimáticos de animais expostos a radiação gama.....	48
FIG. 4.2 Parâmetros hematológicos de animais expostos a radiação gama.....	52
FIG. 4.3 Parâmetros metabólicos de animais expostos a radiação gama.....	55
FIG. 4.4 Sistema antioxidante de animais expostos a radiação gama.....	59
FIG. 4.5. Resumo das análises em todos os parâmetros avaliados.....	61

LISTA DE TABELAS

TAB.1.1 Valores do fator de qualidade efetivo para diversos tipos de radiação.....26

TAB.1.2 Unidades de dose de radiação e definições26

RESUMO

Dentro do âmbito da Engenharia Nuclear este trabalho visa estudos com a finalidade de mitigar efeitos biológicos da radiação ionizante em cenários tanto relacionados ao terror como a acidentes radiológicos e nucleares. A exposição à radiação ionizante pode levar a efeitos tóxicos. Desta forma, pesquisas sobre alimentos ou medicamentos que sejam candidatos a radiomodificador positivo (proteção) podem ser de grande interesse para a Saúde Pública e para Defesa Nacional. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo testar um alimento, o suco de uva negra (*Vitis labrusca*) orgânico como um potencial radiomodificador positivo dos efeitos biológicos que se relacionam à Síndrome Aguda da Radiação (SAR) devido à exposição externa à radiação gama de corpo inteiro. Para tanto foram utilizados 20 (vinte) ratos Wistar machos divididos em quatro grupos, onde dois grupos foram irradiados de corpo inteiro e de forma aguda por uma fonte de radiação gama utilizando um irradiador de cobalto das instalações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) sediado na USP em São Paulo, capital. Os animais receberam 4mL de suco de uva ou placebo (solução isocalórica de glicose e frutose) ingeridos por gavagem (sonda intragástrica) 01 (uma) semana antes e 04 (quatro) dias depois da irradiação com 6 Gy de dose absorvida de corpo inteiro, quando foram então submetidos à eutanásia. Foram avaliados e comparados os parâmetros fisiológicos e bioquímicos indicativos da SAR, dentre eles anorexia, variação de peso corporal, parâmetros hematológicos e indicadores do metabolismo oxidativo em componente do sistema gastrointestinal, o fígado. Os resultados apontam para uma ação positiva do suco sobre os parâmetros estudados, embora estudos mais aprofundados sejam necessários para se medir a ação efetiva sobre estruturas mais complexas como o DNA e seus mecanismos de reparo.

Palavras-chave: Radiação ionizante, radiomodificadores, metabolismo oxidativo, Síndrome Aguda da Radiação

ABSTRACT

Within the scope of Nuclear Engineering this work aims studies for the purpose of mitigating biological effects of ionizing radiation in both scenarios related to terror as to nuclear and radiological accidents. Exposure to ionizing radiation can rise undesirable toxic effects and for this reason research on food or drugs acting as a positive radiomodifier (protective) is of great interest to Public Health and Defense issues. In this sense, this work was developed to test the grape juice (*Vitis labrusca*) as a positive radiomodifier against the biological effects from radiation exposure that characterize the Acute Radiation Syndrome (ARS). Therefore, 20 male Wistar rats were investigated separated into four groups, where two were whole body gamma irradiated using the cobalt irradiator facility of the Institute for Energy and Nuclear Research (IPEN), located at USP in São Paulo. The rats received 4mL of grape juice or placebo (isocaloric solution of glucose and fructose) ingested by gavage (stomach tube) 01 week before and 04 days after irradiation with 6Gy of absorbed dose of whole body when they were sacrificed. Were evaluated and compared the physiologic and biochemical parameters indicative of ARS (anorexia, body weight and of the major organs, hematological parameters, and indicators of oxidative metabolism in the gastrointestinal system (liver). The results suggest a positive action of the juice on the evaluated parameters, although further studies are needed to measure the effective action in more complex structures such as DNA and its repair mechanisms.

Keywords: Ionizing radiation, radiomodifier, oxidative metabolism, Acute Radiation Syndrome

1 INTRODUÇÃO

1.1 RADIAÇÕES IONIZANTES

A radiação eletromagnética pode ser explicada como uma perturbação onde campos elétricos e magnéticos estão conjugados e defasados no espaço. É vibração simultânea de campos magnético e elétrico, perpendiculares entre si, originados durante uma transição que pode ser ocorrer quando uma entidade quântica modifica seu estado de energia, que pode ser caracterizado pelo momento angular, spin e paridade. (TAUHATA et al 2006).

Mesmo no vácuo a perturbação eletromagnética pode se propagar, por meio da autogeração recíproca dos campos acoplados. Dado seu caráter periódico, as ondas são caracterizadas por um “comprimento de onda” (ou seja, o espaço entre a repetição de dois máximos sucessivos). Como a velocidade da luz é constante ($c \approx 3,0 \times 10^8$ m/s no vácuo), o comprimento de onda e sua frequência de oscilação podem se relacionar de forma simples. Desta forma, quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência da onda eletromagnética associada. A figura 1.1 mostra de forma simplificada, a fração do espectro eletromagnético, relacionado com o tamanho dos objetos e entidades físicas, dando uma melhor noção de dimensionalidade (ANDRADE;BAUERMANN, 2010).

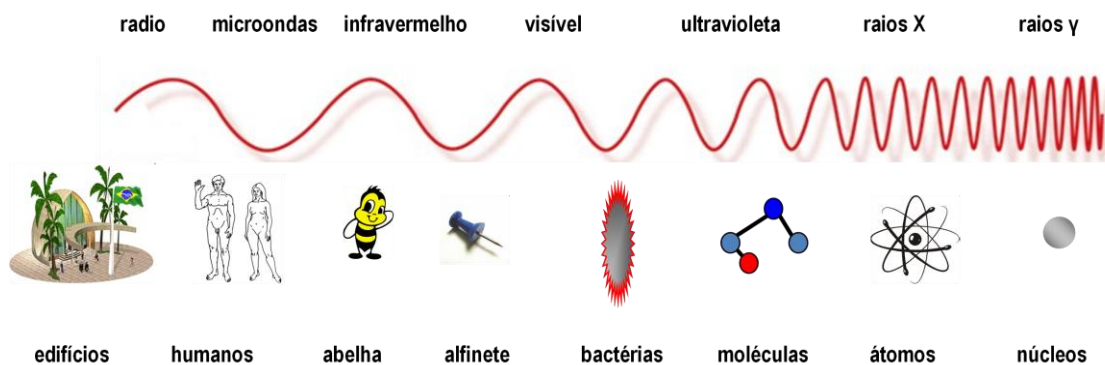


FIG. 1.1 Espectro eletromagnético. Fonte: ANDRADE; BAUERMANN, 2010 pág.16.

Na interação da radiação eletromagnética com a matéria, a absorção e a emissão de energia só ocorre em quantidades discretas de energia denominadas quanta ou fótons (OKUNO, 2007). A energia E de um fóton é dada pela equação:

$$E = h \times f \quad (1)$$

Onde h é a constante de Planck cujo valor é de $4,14 \times 10^{-15}$ eV e f é a frequência da onda eletromagnética (KAPLAN, 1978).

As radiações eletromagnéticas podem ser produzidas em processos de ajustes que ocorrem no nível nuclear ou das camadas eletrônicas, podendo, ainda, ser produzidas pela interação de outras radiações com o núcleo atômico ou com o átomo como um todo (KNOLL, 1989). As radiações eletromagnéticas ionizantes de interesse são as radiações X e gama (γ), e diferenciam entre si pela forma como são produzidas e por sua intensidade e energia.

A radiação gama é produzida quando um núcleon (partícula do núcleo atômico) está fora da configuração de equilíbrio, em estado excitado, e assim, para atingir o estado fundamental há emissão da energia excedente sob a forma de radiação eletromagnética, denominada radiação gama (TAUHATA et al 2006), Conforme ilustrado na figura 1.2.

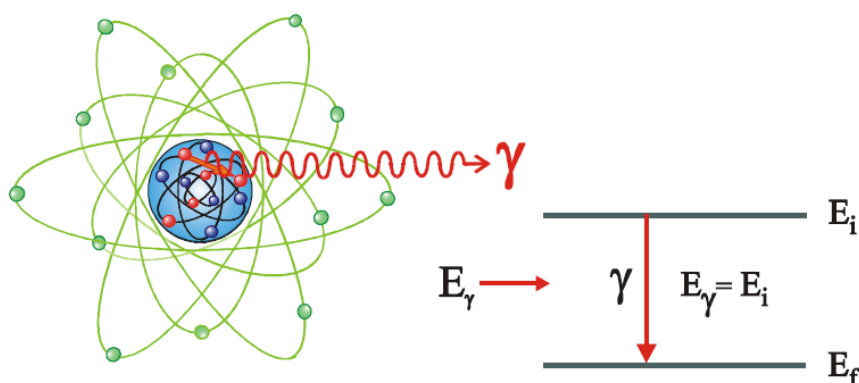


FIG. 1.2 Representação da emissão da radiação gama pelo núcleo. Fonte: (Tauhata, 2006)

A energia da radiação gama é definida pela diferença entre as energias dos estados inicial e final, envolvidos na transição. A radiação gama pode também ser produzida por processos de aniquilação, que podem ocorrer quando um pósitron, após perda de energia cinética, interage com um elétron, a matéria é então transformada em energia, sendo emitidos dois fótons com energia discreta de 0,511

MeV. (TAUHATA et al, 2006). Apesar de não ser de origem nuclear, esta radiação também é chamada de radiação gama em função das energias envolvidas e por não representar reação de ajuste de decaimento orbital atômico ou frenamento eletrônico.

Já os raios-X são produzidos fora do núcleo atômico, quando elétrons que se movem rapidamente atingem um alvo denso. De acordo com a eletrodinâmica clássica, uma partícula carregada que se move, emite radiação eletromagnética quando é acelerada. A frenagem abrupta de um elétron origina um pulso de radiação X (KAPLAN, 1978), como pode ser verificado na ilustração apresentada na figura 1.3. Este processo é conhecido como radiação de frenamento ou *bremsstrahlung*. Como o processo depende da energia cinética e da intensidade de interação da partícula incidente com o campo elétrico do átomo, a energia da radiação produzida pode variar de zero até um valor máximo, sendo seu espectro contínuo (TAUHATA et al, 2006).

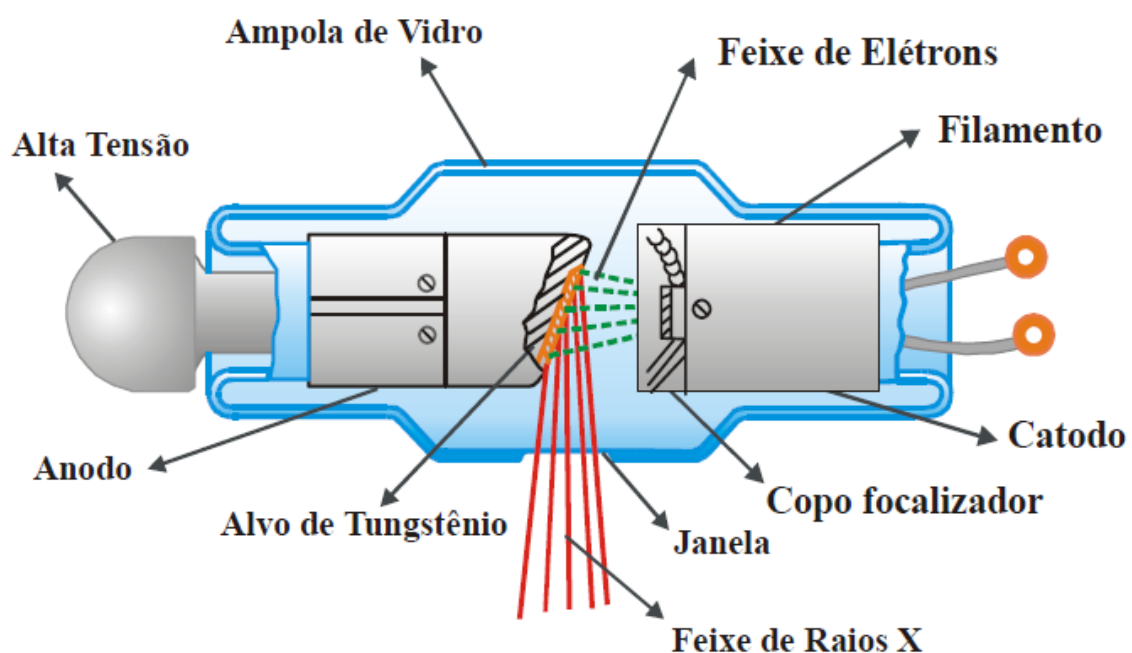


FIG. 1.3. Representação da emissão da radiação de frenamento.

Raios-X também podem ser originados na eletrosfera. Quando ocorre uma captura eletrônica ou outro processo que retire elétrons da eletrosfera do átomo, a vacância originada é imediatamente preenchida por algum elétron de orbitais superiores (KNOLL, 1978). Ao passar de um estado menos ligado para outro mais

ligado (por estar mais interno na estrutura eletrônica), o excesso de energia é liberado por meio de emissão de radiação eletromagnética, chamada de raio-X característico (TAUHATA et al 2006). A denominação “característico” se deve ao fato dos fótons emitidos serem monoenergéticos e revelarem detalhes da estrutura eletrônica do elemento químico em questão, possibilitando a identificação dos elementos químicos que compõem o alvo, por técnicas de espectrometria.

Quando a radiação possui energia suficiente para liberar um dos elétrons orbitais de átomos neutros, transformando-os em um par de íons, ela é denominada radiação ionizante. Conceitualmente, radiação ionizante é a radiação eletromagnética ou partícula de alta energia que, ao interagir com o meio absorvedor, tem a propriedade de transferir, integral ou parcialmente, energia para os átomos e moléculas deste meio, resultando no fenômeno conhecido como ionização (KAPLAN, 1978).

Por apresentarem energia suficiente para ionizar átomos e moléculas, são capazes de alterar conformações eletroquímicas, resultando elétrons livres de alta energia, íons positivos ou radicais livres, que são responsáveis por produzir quebras de ligações químicas das mais variadas. Por sua vez, esses elétrons, por meio de processos de dissipação de energia, transferem sua energia aos átomos e moléculas dispostos ao longo do caminho em seu percurso, provocando novas sequências e de ionizações. Desta forma, os efeitos de maior ou menor importância biológica, conforme o tipo de organismo ou tecido irradiado, serão consequência das alterações físico-químicas no meio biológico exposto à ação da radiação ionizante.

Conforme já descrito, radiações ionizantes são as capazes de produzir íons, radicais e elétrons livres na matéria que interage. Pode-se ainda, definir radiação ionizante como aquela que apresenta comprimento de onda menor que 1000 angstroms ou energia acima de 12,4 eV (BIRAL, 2002). A partir de 12,4 eV, a maior parte dos átomos ou moléculas simples (compostos elementares de hidrogênio, carbono, nitrogênio e oxigênio, abundantes em meio biológico) podem ter seus elétrons mais exteriores ejetados (BIRAL, 2002). Esta é aproximadamente a energia de ionização da molécula de água, principal constituinte biológico em organismos de nível superior como os humanos e mamíferos em geral (TAUHATA et al 2006).

No processo de transferência de energia da radiação incidente para a matéria, as radiações que manifestam carga, como elétrons, partículas α e

fragmentos de fissão, por exemplo, atuam principalmente por meio do seu campo elétrico e transferem sua energia para muitos átomos ao mesmo tempo, sendo denominadas radiações diretamente ionizantes, pois tem ação direta sobre os átomos e sem etapas intermediárias causa ionização (TAUHATA et al 2006).

Já os nêutrons e as radiações eletromagnéticas, por não apresentarem carga elétrica líquida, não originam campo elétrico e assim interagem de maneira individual, transferindo sua energia a elétrons que por sua vez irão iniciar uma cascata de eventos gerando novas ionizações como descrito anteriormente. A interação que ocorre desta maneira é denominada indiretamente ionizante (OKUNO 2007). Estas radiações interagem de modo indireto com as células, provocando a quebra de moléculas de água podendo levar a uma extensa contaminação do ambiente intra e extracelular devido à produção de metabólitos reativos capazes de causar dano biológico expressivo (TAUHATA, 2003). A figura 1.4 mostra um esquema geral de classificação das radiações eletromagnéticas e particuladas. (ANDRADE; BAUERMANN, 2010).

No contexto das radiações indiretamente ionizantes, a palavra interação é aplicada aos processos nos quais a energia e/ou a direção da radiação é alterada. Tais processos, embora se possa prever de forma bastante confiável, são randômicos e, desta forma, só é possível calcular a probabilidade de ocorrência das interações (TAUHATA et al 2006).

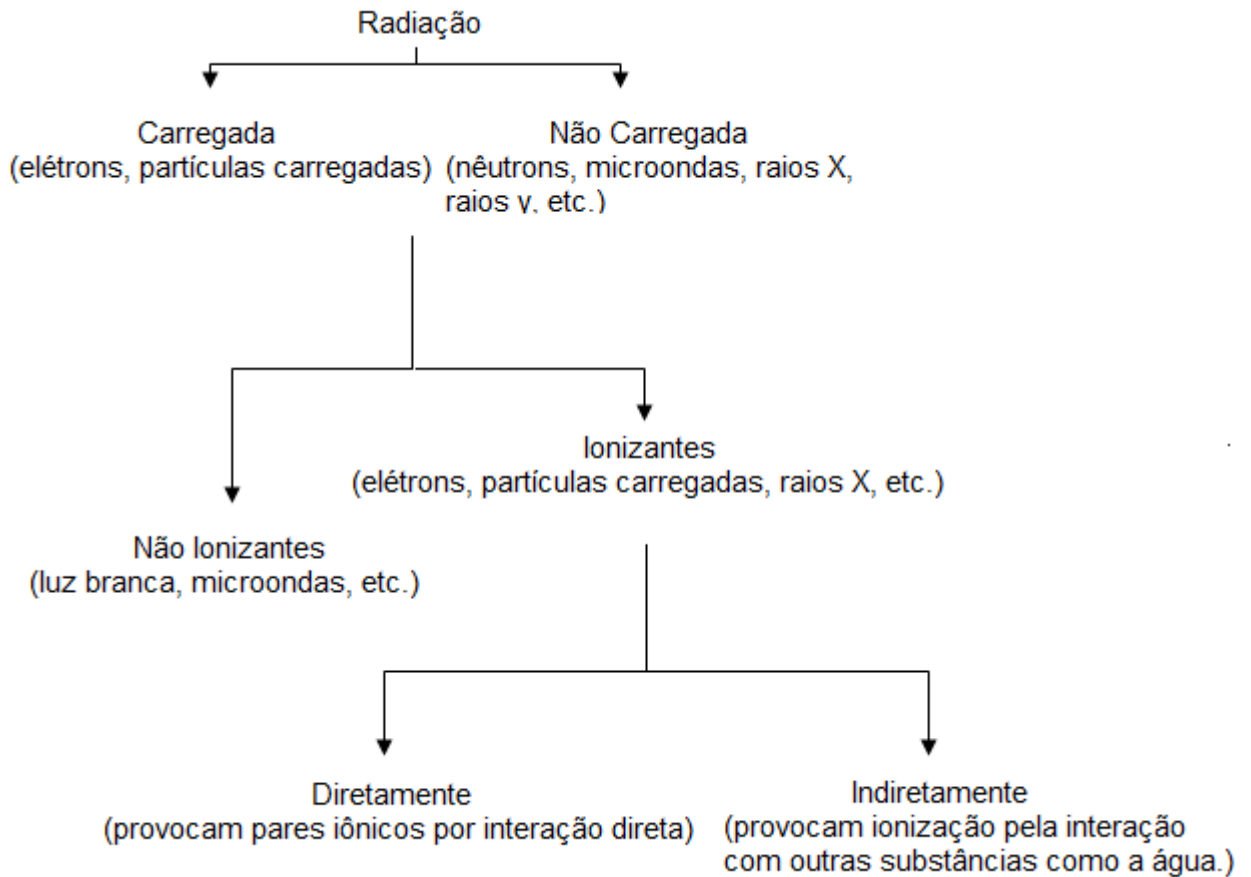


FIG. 1.4 - Esquema geral de classificação das radiações ionizantes e não ionizantes. Fonte: ANDRADE; BAUERMANN, 2010, pag. 16.

1.2 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

As radiações eletromagnéticas ionizantes de interesse para este trabalho são as radiações X e gama. Devido à ausência de carga de repouso, estas radiações podem penetrar em um meio material, percorrendo grandes espessuras antes de sofrer a primeira interação. A probabilidade de ocorrer uma interação de determinada radiação com um meio material é dada pela seção de choque.

A seção de choque (σ) para uma radiação em relação a um dado material pode ser representada pela área aparente que um centro de interação (núcleo, elétron, átomo) apresenta para que haja uma interação. A dimensão da seção de

choque é L^2 e a unidade no SI é o m^2 . Como é utilizada para dimensões da ordem do raio do núcleo, é adotada uma unidade especial, o *barn* (b), que vale $10^{-28} m^2$. (KAPLAN, 1978).

Assim, quanto maior a área oferecida, que pode ser interpretada como uma seção transversal efetiva, maior a probabilidade de interação. Como mostra a figura 1.5 (ANDRADE e BAUERMANN, 2010).

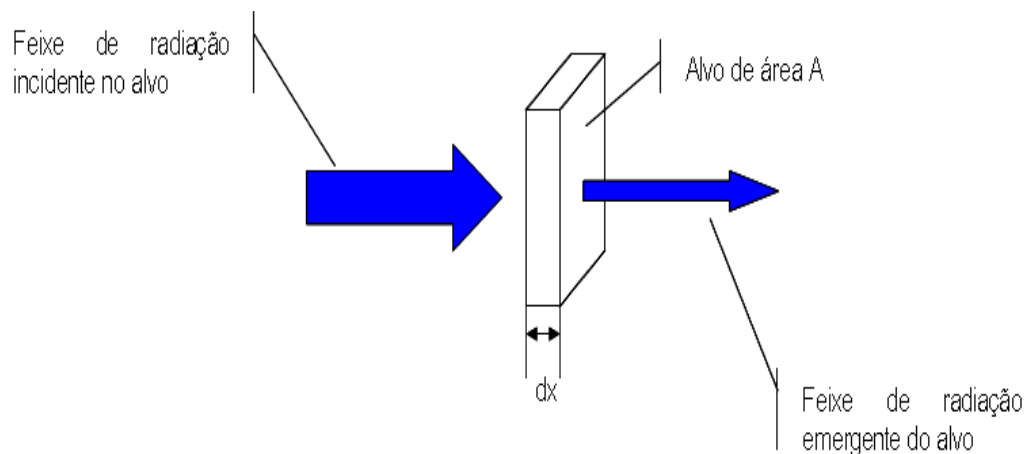


FIG. 1.5 – Representação geométrica do conceito de seção de choque diferencial. Fonte: ANDRADE, BAUERMANN, 2010. Pág. 22.

Os principais modos de interação, excluindo as reações nucleares, são o efeito fotoelétrico, o efeito Compton e a produção de pares, todos apresentando dependência energética para ocorrência.

1.2.1 EFEITO FOTOELÉTRICO

Ao interagir com a matéria, os fótons poderão provocar processos de excitação (absorção, ou de nova emissão de radiação) em alguns átomos ou moléculas do meio. Porém, à medida que a energia dos fótons aumenta, ocorrerá ionizações e dissociações, resultando assim no surgimento de pares íons/elétrons livres.

A liberação de um elétron fortemente ligado ao núcleo do átomo, devido à absorção de um fóton, é um processo conhecido como efeito fotoelétrico. Por meio desta interação, o fóton incidente desaparece, um íon é formado, e o elétron livre resultante, produto da ionização, é colocado em movimento com a energia original do fóton subtraída a energia de ligação que esse elétron apresentava (BIRAL, 2002). A figura 1.6, ilustra o processo do efeito fotoelétrico.

A probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico é proporcional à densidade do meio que está interagindo com a radiação, e cresce também com o número atômico dos elementos constituintes do meio (proporcional a Z^3) (TSOULFANIDIS, 1995). No entanto decresce rapidamente à medida que a energia do fóton aumenta.

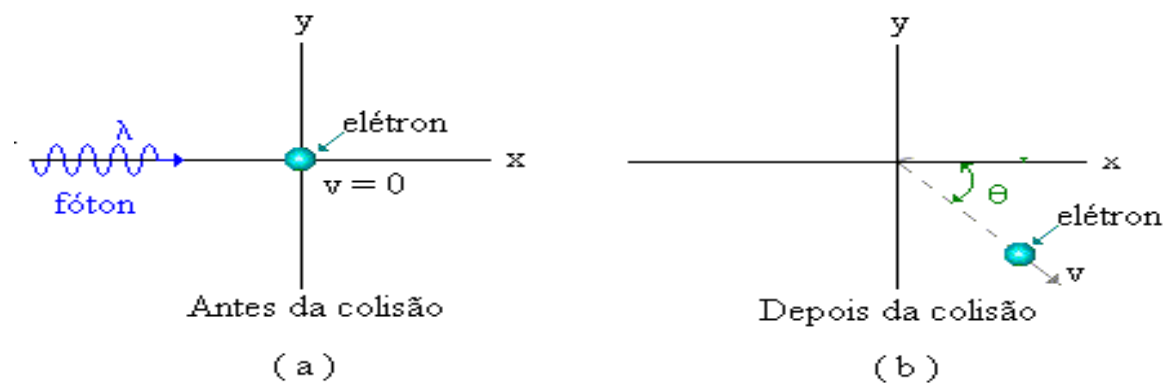


FIG. 1.6 - Ilustração do efeito fotoelétrico. Fonte: ANDRADE 2010, pág. 24.

1.2.2 ESPALHAMENTO COMPTON

No espalhamento Compton, o fóton é espalhado por um elétron de baixa energia de ligação, que recebe somente parte de sua energia, continuando sua trajetória dentro do material, porém em outra direção (TAUHATA et al 2006). À medida que a energia dos fótons aumenta, eles se comportam como partículas que colidem com os elétrons dos átomos. Dessa forma não só o elétron atingido é liberado, como um fóton espalhado também emerge da colisão. Este fóton (de maior energia) poderá ainda continuar provocando outras interações ou provocar efeito fotoelétrico. Este tipo de espalhamento é importante na faixa de energia típica dos

raios-X (isto é, para energias maiores que algumas dezenas de KeV). Na figura 1.7, que ilustra este processo, pode-se observar que ainda resta parte da energia do fóton incidente sob a forma de um fóton remanescente, embora com energia menor.

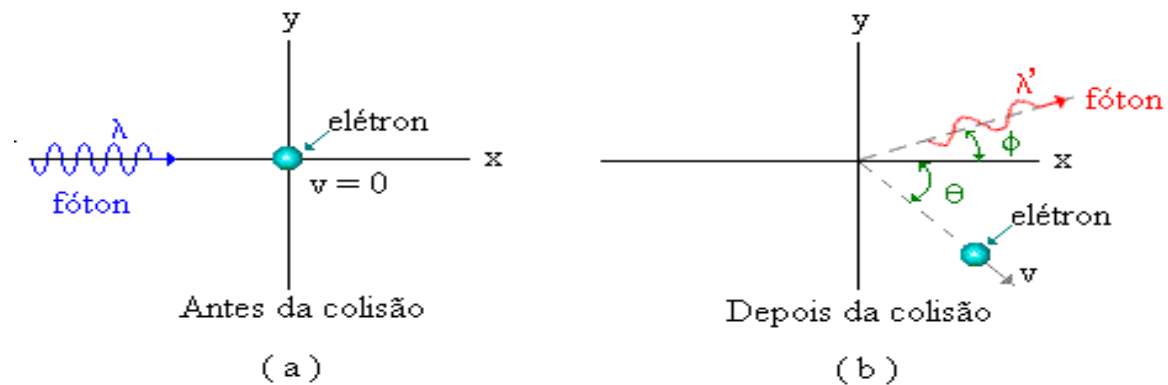


FIG. 1.7 - Ilustração do espalhamento Compton. Fonte: ANDRADE 2010, pág. 25.

1.2.3 PRODUÇÃO DE PARES

Outro modo de interação dos fótons de alta energia com a matéria é a produção de pares elétron-pósitron. Ocorre quando fótons de energia superior a 1,022 MeV passam perto de núcleos de numero atômico elevado, interagindo com o forte campo nuclear. (TAUHATA et al 2006). Este processo resulta na produção de pares elétron-pósitron. Caso o fóton que sofreu interação tenha energia maior que 1,022 MeV, o excedente de energia poderá ser convertido, em energia cinética para cada uma das partículas (BIRAL, 2002).

Os diferentes processos são predominantes conforme a faixa energética dos fótons incidentes e o numero atômico efetivo do meio incidente. Por exemplo, o tecido humano em geral, apresenta numero atômico efetivo relativamente baixo, favorecendo a predominância, para energias abaixo de uma centena de keV, do efeito fotoelétrico.

As interações fotoelétricas predominam para todos os materiais em energias de fótons suficientemente baixas, mas à medida que a energia cresce o efeito Compton se torna predominante (TAUHATA et al 2006). A figura 1,8 mostra a variação da participação de cada efeito para a variação da energia e de Z.

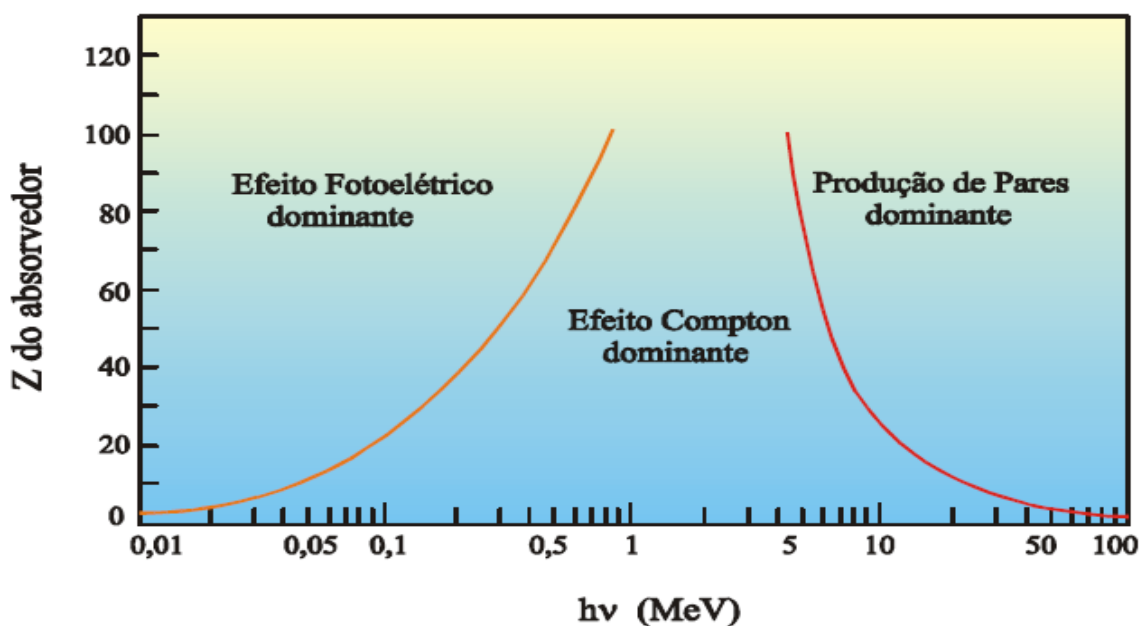


FIG. 1.8 – Relação dos processos de interação em função da energia e de Z. Fonte: Tauhata 2006.

1.3 DOSIMETRIA DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

Historicamente, as grandezas utilizadas para quantificar a radiação ionizante basearam-se no número total de eventos ionizantes ou, ainda, na quantidade total de energia depositada, geralmente em uma massa definida de material (XAVIER et al, 2006). Essa abordagem não leva em conta a natureza descontínua do processo de ionização, sendo, entretanto, justificada empiricamente pela observação de que essas grandezas podem ser correlacionadas de forma significativa com os efeitos biológicos resultantes.

O conceito de dose foi introduzido em proteção radiológica em analogia ao seu uso em farmacologia, uma vez que se deseja determinar o efeito causado por uma dose de radiação ionizante. O termo “dose” utilizado na farmacologia para humanos significa a quantidade de uma substância aplicada por unidade de massa corpórea do indivíduo para se obter um determinado efeito biológico (MAZZILLI et al, 2002).

1.3.1 DOSE ABSORVIDA

Como a exposição foi definida em termos de ionização no ar, não era adequada para medir a quantidade de radiação absorvida pelo corpo, assim, em 1953 foi introduzida uma nova grandeza a dose absorvida (OKUNO, 2007).

Dose absorvida de radiação ou simplesmente dose, corresponde à energia que a radiação deposita por unidade de massa, medida em erg/g (no sistema CGS) ou Joule/kg (no sistema internacional). Seguindo o sistema CGS a dose absorvida é medida em uma unidade chamada “rad” (*radiation absorbed dose*), $1\text{ rad} = 100\text{ erg/g}$, considerada a unidade padrão até 1975 (BIRAL, 2002). A partir de 1975 optou-se pela adoção da respectiva unidade no Sistema Internacional, denominada “gray”, equivalente portanto a 1 joule/kg . Desse modo $1\text{ gray} = 100\text{ rad}$

Todos esses valores de dose absorvida são relativamente pequenos, especialmente quando a energia depositada é associada a um equivalente aumento da energia termodinâmica do sistema. Da definição de caloria, temos que 1 caloria “é a quantidade de energia necessária a promover o aumento de 1°C em 1 grama de água” (EBBING, 1998). No sistema internacional, $1\text{ caloria} = 4,184\text{ joules}$. Supondo o depósito de energia $4,2\text{ Gy}$ em um meio aquoso, tem-se a relação $4,2\text{ Gy} = 4,2\text{ joule/kg} = 0,0042\text{ joule/g} = 0,001\text{ cal/g}$.

Portanto, com o depósito de $4,2\text{ Gy}$, consegue-se um aumento de temperatura equivalente de apenas $0,001^{\circ}\text{C}$. No entanto, um depósito de uma dose de $4,5\text{ Gy}$ de corpo inteiro em um ser humano é considerado como o valor de dose letal para metade das pessoas irradiadas em um período de até 30 dias após a exposição Dose Letal 50/30 ($DL_{50/30}$), que leva a óbito 50% da amostra em 30 dias, ainda que esforços atuais em Medicina sugerem a possibilidade de elevação deste patamar de $DL_{50/30}$ para valor próximo a 8 Gy . Desta forma, mais do que ao aumento da temperatura do sistema, o dano causado pelas radiações ionizantes deve-se principalmente ao depósito de energia no meio biológico irradiado (TAUHATA *et al* 2006).

1.3.2 DOSE EQUIVALENTE

As grandezas previamente definidas levaram em conta a energia absorvida no ar e no tecido humano, porém, ainda não dão uma idéia mais concreta dos efeitos biológicos no homem. Para fins de radioproteção, o *rad* demonstrou ser uma unidade satisfatória para medir raios-X, raios gama e elétrons, porque o dano biológico causado por estes tipos de radiação é aproximadamente proporcional à energia depositada. No entanto, esta proporcionalidade não se mantém no caso de partículas mais fortemente ionizantes, como produtos de fissão, partículas alfa e prótons. Foi então definida a grandeza *dose equivalente*, cujo símbolo é H e que considera o tipo de radiação ionizante, para avaliar os possíveis danos biológicos. (MAZZILLI, 2002).

A dose equivalente é numericamente igual ao produto da dose absorvida (D) pelo fator de qualidade Q. O fator de qualidade Q relaciona o efeito de diferentes tipos de radiação em termos de danos aos tecidos. O valor Q representa o poder de ionização dos diferentes tipos de radiação ionizante no meio.

$$H = D \cdot Q \quad (2)$$

O fator de qualidade médio (Q_T) para um tecido específico ou órgão T, é obtido por

$$Q_T = \frac{1}{m_T D_T} \int Q D \quad (3)$$

Onde D_T é a dose absorvida média no tecido ou órgão, m_T é a massa do tecido e Q e D são fatores de qualidade e dose absorvida no elemento de massa dm respectivamente. A unidade de dose equivalente (H) depende da unidade utilizada para dose absorvida (D).

Devido à sua maior carga elétrica, maior inércia e velocidade mais baixa, partículas alfa apresentam um traço quase retilíneo de ionizações, e também apresentam um traço de ionizações muito mais denso do que um elétron de energia

equivalente, por isso o fator de qualidade Q para a radiação α e nêutrons com energia desconhecida é igual a 20. Para prótons e partículas com uma unidade de carga e com massa de repouso maior que uma unidade de massa atômica e de energia desconhecida, recebe o fator Q igual a 1, e para raios X, γ e elétrons o fator é 1 (ICRP 103,2007)

TAB. 1.1 – Valores do fator de qualidade efetivo pra diversos tipos de radiação.

Tipo de radiação	Fator de qualidade (Q)
Raios-X, Raios Gama, Elétrons	1
Prótons de alta energia	2
Partículas Alfa, Produtos de Fissão	20

Fonte: (ICRP 103,2007)

A unidade antiga da dose equivalente é o rem (*roentgen equivalent man*). No sistema internacional, a unidade nova de dose equivalente é o sievert (Sv) e 1 Sv equivale a 100 rem (KNOLL, 1989). A tabela 1.2 mostra um resumo das unidades principais utilizadas em radioproteção e definições.

TAB. 1.2 – Unidades de dose de radiação e definições clássicas

	Unidade Especial	Sistema Internacional	Relações
Dose Absorvida (D)	Rad	gray (Gy)	1Gy = 100 rad
Dose Equivalente (H)	Rem	sievert (Sv)	1Sv = 100 rem

1.4 CONTAMINAÇÃO E EXPOSIÇÃO

Na prática, o termo exposição é empregado para indicar a exposição externa de organismos, parte de organismos ou, mesmo, materiais, à radiação ionizante. Tanto os raios-X quanto os gama não tornam radioativos os seres humanos irradiados (expostos), não havendo, portanto nenhum risco de contaminar outras pessoas ou o ambiente. Entretanto, se uma pessoa ingerir, inalar ou sofrer contaminação com radionuclídeos, esta poderá se tornar uma fonte. O termo

contaminação refere-se à presença indesejável de material radioativo em um organismo ou material.

Os alimentos irradiados, para fins de esterilização, com os raios gama emitidos por uma fonte de césio-137 ou cobalto-60, não se tornam radioativos (OKUNO, 2007). Apenas os alimentos contaminados pela poeira radioativa, ou aqueles que receberam nutrientes radioativos via raiz, podem tornar-se radioativos.

1.5 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

A utilização de radiações ionizantes para uma ampla gama de efeitos cresceu e continua em ascensão desde o holocausto nuclear que ocorreu no fim 2ª Guerra Mundial. Sua utilização envolve uso em tecnologias nucleares e radiológicas aplicadas principalmente às Engenharias e Ciências da Saúde.

A ação da radiação ionizante no organismo humano pode gerar uma cadeia de eventos que se inicia nas modificações de seus átomos e moléculas. “O processo de ionização ao alterar os átomos, pode alterar a estrutura das moléculas que os contém. Se a energia de excitação ultrapassar a energia de ligação entre os átomos, podem ocorrer quebras de ligações químicas e conseqüentes mudanças moleculares (TAUHATA et al 2006).

Quando a radiação interage com as moléculas de água do organismo humano, essas moléculas se quebram formando uma série de subprodutos metabólicos danosos ao organismo como os radicais livres e a água oxigenada. Esse processo é chamado de radiólise da água. O processo de radiólise da água é bastante complexo, contudo, sabe-se que a água é em grande parte convertida em radicais livres de hidrogênio (H) e hidroxila (OH). Estes podem ligar-se a outros radicais livres e formar peróxido de hidrogênio ($\text{OH} + \text{OH} = \text{H}_2\text{O}_2$) e hidroperoxila ($\text{H} + \text{O}_2 = \text{HO}_2$), os quais representam as principais substâncias tóxicas para a célula (UDENIGWE et al., 2008). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre. Entretanto, tem importância principalmente pela sua capacidade de atravessar membranas biológicas e dar origem a outras espécies reativas com alto potencial de

lesão no sítio do DNA (potencial genotóxico) como, por exemplo, o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (ANDRADE, 2010).

O DNA, (*DeoxyriboNucleic Acid*), é um longo polímero formado duas cadeias de unidades repetidas chamadas nucleotídeos (BIRAL, 2002). Existem quatro subunidades de nucleotídeos, e as duas cadeias unem-se através de pontes de hidrogênio. O dano no DNA ocorre pelo depósito de energia pela radiação ionizante no sítio alvo, geralmente levando a quebras simples da dupla hélice (*Single Strand-Breaks* – SSB), quebras duplas da dupla hélice (*Double Strand-Breaks* – DSB), danos nas bases nitrogenadas, nas fitas entre outros (SAPORA et al., 1991; LEHNERT, 2008). Quando ocorre uma alteração química do DNA devido a ionizações provocadas diretamente por fótons ou por partículas de alta energia, ocorre uma ação direta. No entanto boa parte dos danos causados a uma célula (cerca de 70% dos efeitos biológicos) ocorre pelo efeito da ação indireta, proporcionado pela ação de radicais livres produzidos em meio aquoso. A figura 1.9 ilustra resumidamente estes mecanismos.

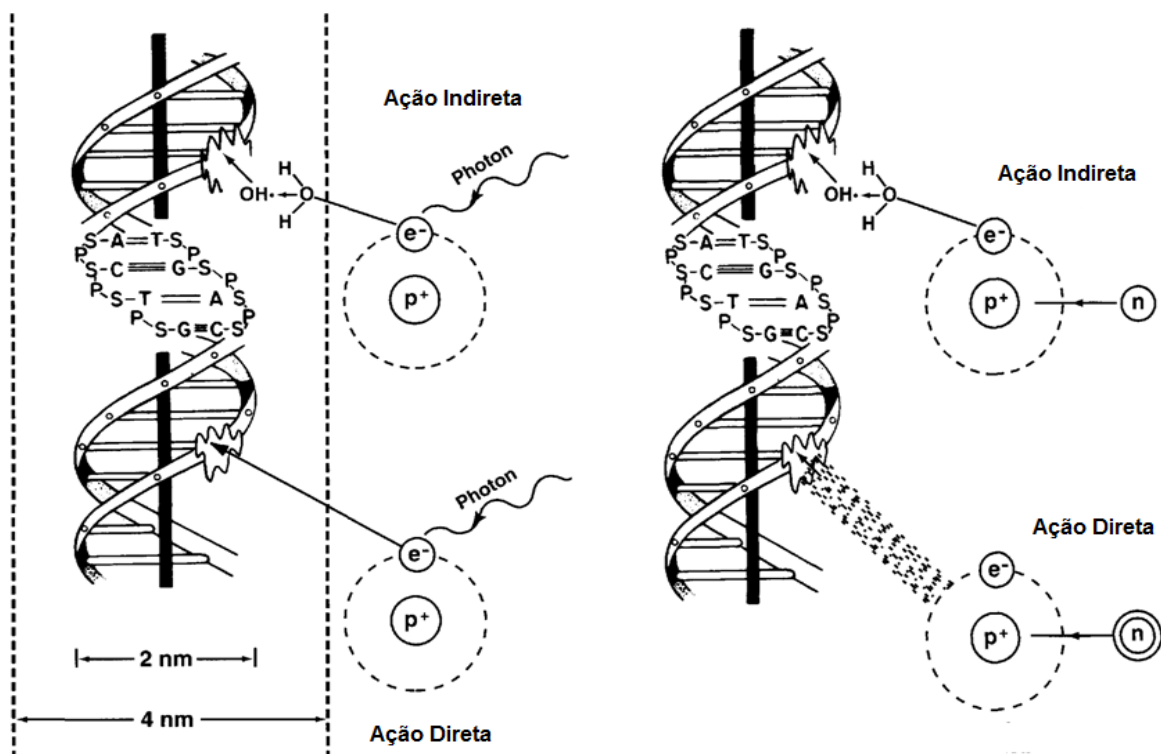


FIG. 1.9 – Dano radioinduzido ao DNA. Fonte: adaptado de www.springboard4health.com/

A partir de evidências epidemiológicas de exposição humana em situações de guerra, acidentes nucleares e radiológicos, exposição ocupacional ou terapêutica crônica e de estudos experimentais podem ser reconhecidos quatro estágios toxicológicos da exposição à radiação ionizante: (a) ionização e excitação dos átomos; (b) ruptura das ligações químicas de moléculas com produção de radicais livres; (c) ligação dos radicais livres a macromoléculas, especialmente o DNA, proteínas e lipídios (estresse oxidativo), e (d) aparecimento de outros efeitos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos propriamente ditos (TAUHATA et al 2006).

Os efeitos das radiações ionizantes sobre os organismos vivos dependem não somente da dose por eles absorvida, mas também, da taxa de absorção (aguda ou crônica) e do tipo de tecido atingido (MÜLLER, 1927).

No caso de exposição de seres humanos a altas doses de radiação, como em acidentes nucleares, uma grande parte das células do corpo é afetada, geralmente impossibilitando a sustentação da vida. Por outro lado, há ainda, muita incerteza quanto aos efeitos da exposição de pessoas a baixas doses de radiação uma vez que, caso haja efeitos, estes, via de regra, são mascarados pela ocorrência natural de doenças que podem ou não ser provocadas pela exposição à radiação, como é o caso do câncer. Entretanto, existe grande dificuldade de se encontrar evidências de que uma alteração orgânica é consequência exclusiva da exposição à radiação ionizante (BOLUS, 2001).

Os efeitos radioinduzidos podem receber denominações em função do valor da dose e forma de resposta, em função do tempo de manifestação e do nível orgânico atingido. Assim, em função da dose e forma de resposta, são classificados em estocásticos e determinísticos.

Efeitos Estocásticos: são aqueles cuja probabilidade de ocorrência é função da dose, não existindo limiar, como é o caso do câncer. Assim, para qualquer indivíduo irradiado há uma chance de que certos efeitos atribuíveis à radiação se manifestem, mas só depois de um período de tempo longo (dezenas de anos) a partir do momento que ocorreu o evento de irradiação (XAVIER et al, 2006).

Efeitos determinísticos: São efeitos causados por irradiação total ou localizada de um tecido, causando um grau de morte celular não compensado pela reposição ou reparo, com prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão (TAUHATA et al 2006). Isto pode significar que os efeitos determinísticos são

produzidos por doses elevadas, acima de um limiar, onde a severidade do dano aumenta com a dose aplicada.

Impulsionado pela Segunda Guerra Mundial, o crescente interesse por aplicações da energia nuclear acarretou, na década de 50, avanços importantes na área de proteção radiológica, tendo sido adotada uma atitude cautelosa segundo a qual toda radiação, por menor que seja a dose absorvida por organismo vivo, pode causar danos à saúde.

Não há valores seguros de dose para exposição à radiação ionizante. Isto significa que, muitas vezes, mesmo aquelas doses consideradas baixas podem acarretar efeitos tóxicos (BIRAL, 2002). Assim, a busca por estratégias que previnam ou atenuem tais efeitos é de grande relevância. Isto se aplica principalmente a grupos expostos e potencialmente expostos como é o caso dos pacientes submetidos à radioterapia, trabalhadores da área nuclear, e militares.

A figura 1.10 mostra de forma resumida um esquema de algumas possíveis vias de exposição. A exposição à radiação ionizante pode comprometer significativamente operações de grande porte como as que são desenvolvidas por militares (ANDRADE,2010).

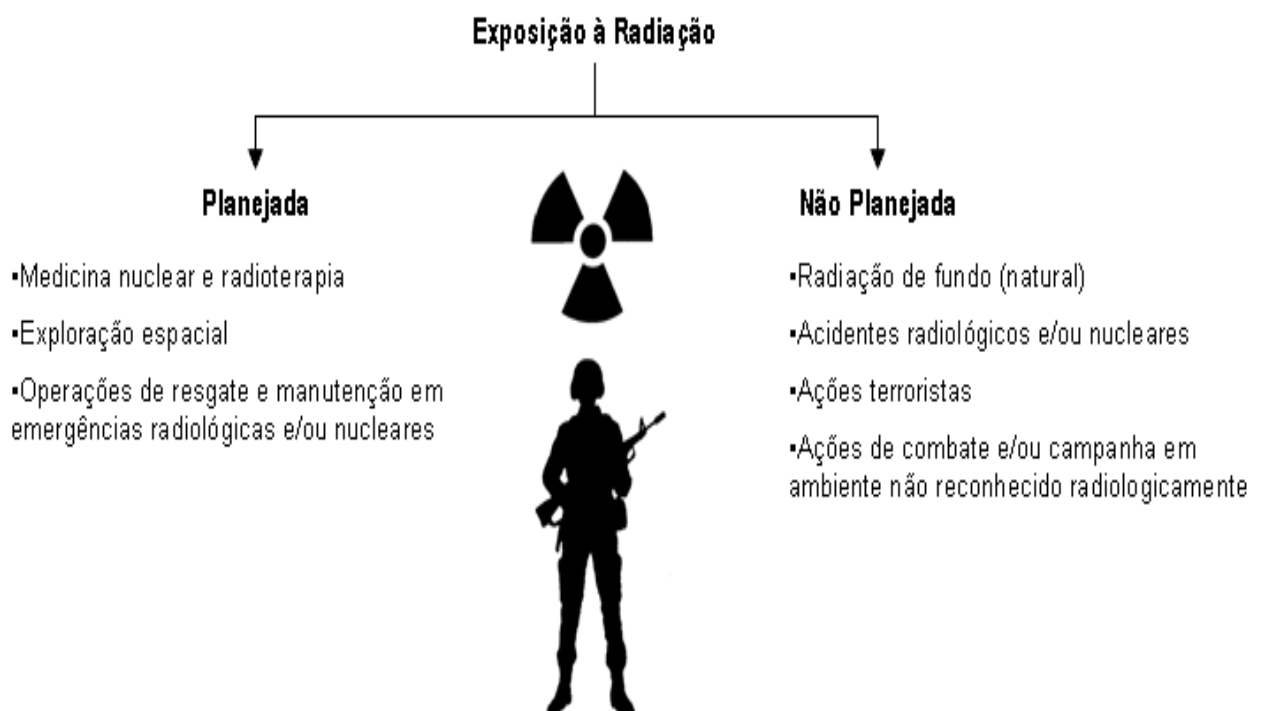


FIG. 1.10 Possíveis vias de exposição. Fonte ANDRADE 2010.

1.5.1 SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO (SAR)

A Síndrome Aguda da Radiação (SAR) é o conjunto de sintomas e sinais clínicos conseqüentes a uma irradiação de corpo total, desenvolvida em um curto período, segundos a minutos. (BITELLI, 2006).

A literatura sugere que para doses de aproximadamente 2Sv (200 rem), aguda e de corpo inteiro, que é a condição de irradiação para desenvolvimento da SAR, as células mais danificadas serão aquelas com maior sensibilidade, como as células da medula óssea (GOANS, 1997). Os linfócitos, que são células produzidas pela medula óssea vermelha, por meio das células-tronco linfoides, apresentam um declínio imediato na contagem, com queda de cerca de 50% nas primeiras 24 horas (GOANS, 1997). Desta forma, os efeitos observáveis durante a manifestação deste estágio da síndrome são relativos a danos nestas células. Tem-se então a observação de desenvolvimento de estados anêmicos, leucopenia, possível infecção, febre e hemorragia. Esta é conhecida como forma de apresentação hematopoiética da SAR.

Com doses mais altas, acima de 8Sv, as células mais danificadas tendem a ser as células do tecido epitelial (mucosa) que revestem o trato gastrointestinal. Quando estas células são danificadas, uma barreira biológica vital é quebrada (MAZZILLI et al, 2002), dando lugar a uma perda de fluidos, a infecções e diarreia. Esta é conhecida como forma gastrointestinal da síndrome aguda da radiação.

Para doses acima de 50 Sv, as células relativamente resistentes do sistema nervoso central provavelmente apresentarão danos intensos e o organismo afetado rapidamente apresentará sintomas, apresentando convulsões, estado de choque e desorientação (MAZZILLI et al, 2002). Esta é conhecida como forma neurovascular cerebral ou de sistema nervoso central da síndrome aguda da radiação.

Sem assistência médica adequada, a dose letal de radiação (DL) que leva a óbito 50% das pessoas expostas em um período de 60 dias ($DL_{50/60}$) é estimada no intervalo de 3,5 a 4,0 Gy. Estudos mostram que cuidados clínicos intensivos apropriados podem deslocar a ($DL_{50/60}$) para doses no intervalo de 5,0 a 6,0 Gy (BROWNE et al., 1992). A figura 1.11 mostra de forma resumida os efeitos imediatos da radiação de corpo inteiro.

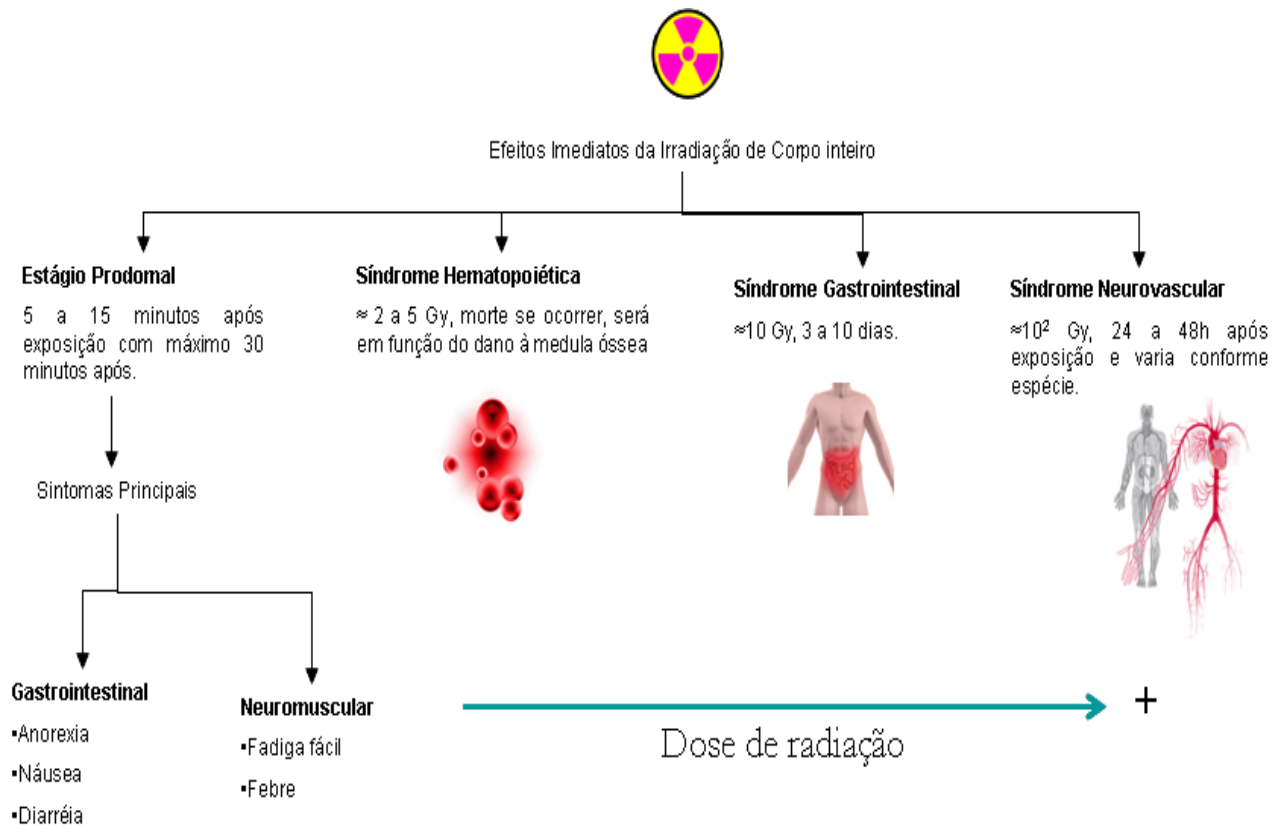


FIG. 1.11 - Efeitos imediatos da radiação de corpo inteiro. Fonte Andrade, 2010.

1.6 SUBPRODUTOS DA UVA COMO POTENCIAIS RADIOMODIFICADORES

Compostos que têm a propriedade de prevenir ou atenuar os efeitos da ionização induzida pela exposição à radiação sobre o organismo, são denominados radiomodificadores (ANDRADE 2010). Estas podem ser substâncias capazes de reduzir o efeito da radiação ionizante, especialmente por meio da catalisação das espécies reativas de oxigênio que são geradas na interação radiação com o tecido.

Uma boa alternativa para a disponibilização rápida para uso como radiomodificador seria o uso de suplementos alimentares ricos em compostos bioativos com ação antioxidante. Alimentos que possuem tais compostos são denominados alimentos funcionais ou nutracêuticos existindo legislação brasileira relacionada (MORALES, 2006). A figura 1.12 ilustra resumidamente a ação do antioxidante.

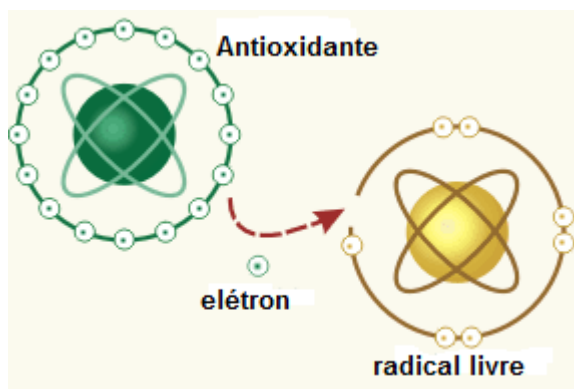


FIG. 1.12 – Antioxidante neutralizando um radical livre.

Fonte: adaptado de www.health-spy.com/oxidative.html.

Como os antioxidantes naturais são componentes dos alimentos ou apresentados como parte deles, apresentando ainda propriedades e funções definidas para a saúde humana, cabe aqui uma breve consideração sobre as definições de alimento funcional e nutracêutico. A ação de um alimento funcional está centrada muito mais na redução de risco que na prevenção de doenças e exclui suplementação alimentar, o que exclui também o domínio farmacológico, inaugurando um campo novo de domínio especial da Nutrição (ANDLAUER, 2002).

O alimento funcional deve se apresentar na forma de consumo final ao usuário, produzir benefícios à saúde de forma específica, como a redução de riscos de doenças, e serem consumidos como parte da dieta. No Brasil a regulamentação dos alimentos funcionais é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio das resoluções Nr 16 a 18 de 30 de abril de 1999. Os alimentos funcionais podem ser classificados quanto à origem: (a) animal e (b) vegetal, e quanto ao benefício que proporciona: (a) sistema gastrointestinal, (b) sistema cardiovascular, (c) metabolismo de substratos, (d) crescimento, desenvolvimento e proliferação celular, (e) comportamento fisiológico e (f) antioxidantes.

O alimento nutracêutico é um alimento ou parte dele, que proporciona benefícios médicos à saúde, incluindo tratamento e/ou prevenção de doenças. Inclui-se aí suplementos na forma de cápsulas, tabletes etc. Antioxidantes como a glutathiona e selênio, assim como os micro-organismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) são utilizados amplamente (ANDLAUER, 2002).

A uva e seus produtos (principalmente o vinho) estão entre os alimentos mais bem investigados quanto às suas propriedades funcionais (YADAV; JAIN et al,

2009). Estudos baseados em evidências epidemiológicas e experimentais mostraram que os compostos polifenólicos presentes na uva, incluindo no suco, principalmente o resveratrol e a quercetina (MENG; MALIAKAL et al. 2004), apresentam propriedades antioxidantes (DANI C et al 2008), antitumorais (KAUR, 2008; KAUR, 2009), antiinflamatórias (UDENIGWE; RAMPRASATH et al. 2008), antimutagênicas (LLÓPIZ et al, 2004), hepatoprotetoras (DANI C et al, 2008), cardioprotetores (LEIFERT, 2008) entre outras.

Estudos recentes relacionando compostos e alimentos à base de uva e a interação do tecido biológico com a radiação ionizante mostram o efeito de polifenóis extraídos da semente deste fruto (SAADA; SAID et al. 2009) e também de seu suco (BORBA et al 2013).

Dentro desta perspectiva, a hipótese de que a ingestão moderada de produtos não-alcóolicos da uva, como o seu suco, também possuiriam propriedades radiomodificadoras contra irradiação gama precisa ser investigada. Tal hipótese representa o principal objeto de estudo do trabalho aqui apresentado.

Os componentes polifenólicos presentes na uva possuem uma estrutura química fundamental para suas propriedades biológicas: (a) atividade antioxidante, (b) interações específicas com os receptores celulares e (c) sua biodisponibilidade, entre outras propriedades (WILLIANS et al, 2004). Os polifenóis apresentam mais de um anel aromático com cada um contendo pelo menos um grupo hidroxil, que lhes confere propriedades antioxidantes (DAVIES et al, 1991). Estudos sugerem que as funções antioxidantes dos flavonóides justificam-se pela habilidade de sua atuar como varredores das espécies reativas do oxigênio e nitrogênio pela doação de elétrons. Flavonóides são, por exemplo, potentes sequestradores de radicais peroxil devido à favorável redução a radicais peroxilalquil, sendo assim, potenciais inibidores da lipoperoxidação, (RAPAPORT, 1990).

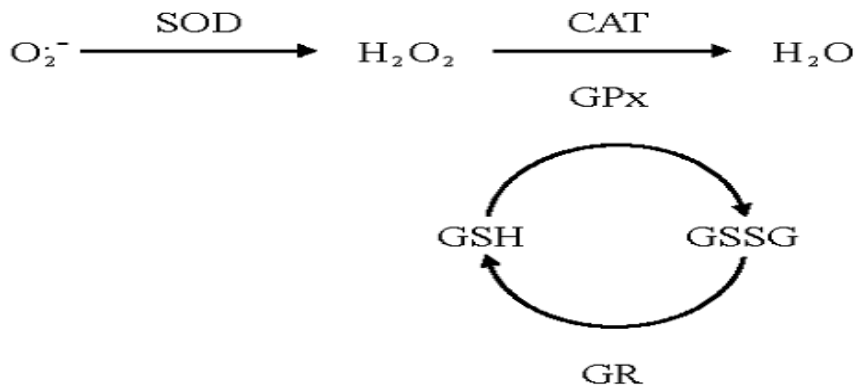
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas existe uma produção constante de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), acompanhada pela sua

contínua inativação por meio da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. Essas espécies reativas produzidas constantemente e sob condições normais nas células eucariotas desempenham funções importantes para o organismo (DROGE, 2002), tais como a proliferação, a diferenciação e a sinalização celular (DENNERY, 2007).

O desequilíbrio entre os fenômenos pró-oxidativos e as defesas antioxidantes celulares pode desencadear mudanças fisiológicas, denominadas genericamente de estresse oxidativo (HALLIWEL, 1992; DAWSON E DAWSON, 1996). A extensão e o tipo de dano causado pelas EROs dependem da quantidade e da natureza das mesmas, bem como das defesas antioxidantes celulares (DAVIES, 1991). As EROs são capazes de causar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e da reação com os constituintes celulares (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 1997). A produção excessiva de EROs pode levar a muitas consequências negativas, entre elas, o dano as biomoléculas alvo, tais como o DNA, lipídios e proteínas (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). Com isso, o estresse oxidativo pode estar relacionado a vários processos deletérios, tais como mutagênese, carcinogênese, peroxidação lipídica, oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (HALLIWEL, 1992).

As principais EROs vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (HO^{\cdot}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONO_2^-). Estes por sua vez são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas tais como a Catalase (CAT), a Superóxido Dismutase (SOD), a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Redutase (GR), além de inúmeros sistemas de defesas não-enzimáticos incluindo as vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e a glutathione reduzida (GSH) (ALEXI et al., 1998; GIANNI et al., 2004). O esquema 1 apresenta as funções das enzimas antioxidantes. A função destes sistemas é manter um equilíbrio entre as EROs formadas naturalmente no metabolismo e a função celular, para que as células realizem com eficiência suas funções.



ESQ. 1: Funções das enzimas antioxidantes. Radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Água (H_2O), Glutathiona oxidada (GSSG).

A concentração da GSH está relacionada com a atividade da enzima GPx e altos valores absolutos da GSH, em especial nos tecidos e plasma sanguíneo, são caracterizados pela sua considerável propagação pelo organismo (LEOŠ NAVRÁTIL, 2008). Por isso, a dinâmica das mudanças pós-irradiação deve ser investigada considerando também os níveis de GSH (BHATTATHIRI et al., 1994).

Dada à impossibilidade de análise de todos os órgãos corporais, as investigações realizadas foram concentradas no fígado. A escolha deste órgão de seu porque estudos anteriores iniciais conduzidos ainda na década de 50, mostraram que o fígado é um órgão radiosensível. Supplee e colaboradores em 1956 relataram aumento do peso deste órgão 6h após irradiação X em ratos, em condições semelhantes às desenvolvidas neste trabalho.

A pesquisa com relação à existência de dano hepático pode ser realizada por meio de exames diagnósticos sorológicos específicos, como a dosagem da atividade enzimática das transaminases, alanina transaminase (*ALT*), aspartato transaminase (*AST*), fosfatase alcalina (FA) e glutamil-transferase (GGT), que é um marcador tumoral (RAPAPORT, 1990). A elevação das transaminases no soro pode ocorrer mesmo após agressão celular mínima e a utilização destes marcadores pode delinear o tipo de dano hepático, sua extensão e o prognóstico de uma possível doença.

A SAR está associada a um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e que pode ser avaliado por meio de medida dos níveis de malondialdeído (MDA) no plasma sanguíneo. Em ratos, isso foi medido por Deger e colaboradores, após

exposição dos animais à irradiação de corpo inteiro a uma dose de 5,5 Gy (DEGER et al., 2003).

Desta forma, pesquisas sobre alimentos ou medicamentos que sejam candidatos radiomodificador positivo (proteção) são de grande interesse para a Saúde Pública e questões de Defesa Nacional. Neste sentido, este trabalho tem como perspectiva testar um alimento, o suco de uva negra (*Vitis labrusca*) orgânico como um potencial radiomodificador positivo dos efeitos biológicos que se relacionam à Síndrome Aguda da Radiação (SAR).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de efeitos radiomodificadores positivos provenientes da ingestão oral do suco de uva (*Vitis labrusca*) em indicadores fisiológicos e bioquímicos relacionados à Síndrome Aguda da Radiação (SAR) em ratos machos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ratos machos Wistar submetidos a uma dose aguda subletal de corpo inteiro de radiação gama, verificar o efeito da ingestão do suco de uva (*Vitis labrusca*) nos seguintes parâmetros toxicológicos associados à SAR:

- Padrão de ingestão alimentar
- Peso total
- Alterações no metabolismo oxidativo do fígado
- Parâmetros hematológicos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo proposto está associado ao Projeto Implantação de Infraestrutura Laboratorial de Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear (QBRN) desenvolvido pelo Centro Tecnológico do Exército (CTEx) em parceria com diversas instituições incluindo o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e o Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD/CNEN). O protocolo experimental foi desenvolvido e conduzido nas dependências do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (IPEN) com parecer número 048/09 CEPA – IPEN/SP.

3.1 DELINEAMENTO GERAL

O desenho experimental incluiu 20 ratos Wistar, machos adultos, de massa corpórea aproximada de 200-250g. Os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais: (a) não irradiados e não suplementados com suco de uva (PNI), (b) não irradiados e suplementados com suco de uva (SNI), (c) irradiados e não suplementados com suco de uva (PI) e (d) irradiados e suplementados com suco de uva (SI). O tamanho amostral mínimo para o desenvolvimento do estudo e também os critérios baseados na ética associados à experimentação animal, foi baseado em estudos prévios como o realizado por Meirelles et al. (MEIRELES GC, 2008) que utilizaram alguns parâmetros metodológicos similares ao proposto neste trabalho.

3.2 CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram mantidos em uma sala individualizada de experimentação animal do Biotério em condições controladas de luminosidade (fotoperíodo de 12 horas claro/escuro), temperatura ($20,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e umidade (80-85%). A ração sólida dos animais é a padronizada e rotineiramente utilizada pelo Biotério do IPEN/CNEN/USP.

3.3 CONDIÇÕES GERAIS DE TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Ao longo de todo o tratamento os animais receberam ração e água *ad libitum*. Adicionalmente, 50% da amostra total recebeu por meio de sonda intragástrica (gavagem) suco de uva e 50% uma solução isocalórica de glicose/frutose a fim de ser descartado o possível efeito do aumento na ingestão de glicose no estudo. A concentração de glicose/frutose na solução foi de 19% em concordância com análise bromatológica prévia realizada no lote do suco engarrafado utilizado nos experimentos. A dose diária de suco de uva ou placebo foi de 4mL em duas etapas de 2 mL cada, em intervalos de 12 horas. A dose foi definida em função do volume do estômago dos animais.

3.4 CARACTERIZAÇÃO BROMATOLÓGICA E QUÍMICA DO SUCO DE UVA

O suco de uva (*Vitis labrusca*) da variedade Bordô produzido e engarrafado pela Empresa Econatura Ltda e gentilmente doado para o estudo foi o proveniente de produção orgânica das uvas cujo processo envolve a prensagem, aquecimento até 80°C durante duas horas e engarrafamento sem adição de açúcar ou conservantes químicos, onde o vácuo executa este papel.

A safra da produção do suco de uva foi a de 2007/08. A empresa possui controle de produção da uva, sem uso de agrotóxicos, certificado pela Ecocert do Brasil. Informações adicionais podem ser obtidas por meio do site:

<http://www.econatura.com.br>. Dados bromatológicos fornecidos pelo produtor mostram que em 100 mL de suco existem: 1% de proteínas, traços de lipídios (<0.5%), 38% de carboidratos, 19% de frutose, 23mg de cálcio, 0,6 mg de ferro, 20 UI de vitamina A e traços de vitamina C. A concentração dos principais compostos bioativos (mg/L) do produto avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência(HPLC) mostram os seguintes valores: resveratrol, $3,95 \pm 0,01$; quercetina $8,95 \pm 0,09$; rutina $3,75 \pm 0,03$; ácido gálico $81,07 \pm 2,03$, ácido cafeíco $30,28 \pm 2,00$, flavonóides totais $0,249 \pm 0,002$.

3.5 CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO GAMA

A irradiação dos animais foi realizada utilizando-se um sistema de irradiação gama de amostras do CTR/IPEN, utilizando-se uma fonte de ^{60}Co . Para a exposição à radiação os ratos foram anestesiados via administração intraperitoneal utilizando pentobarbital a 0.6% em solução salina (10mL/kg de peso corporal) 15 a 20 minutos antes da irradiação. Para assegurar que o anestésico tenha tido efeito foi avaliado a perda do reflexo palpebral e plantar e manutenção da respiração espontânea ao longo do procedimento. Os animais foram colocados em *decúbito pronus* e expostos a uma única dose de radiação de corpo inteiro de 6 Gy. A taxa de dose de radiação gama foi de aproximadamente 0,40 Gy/minuto e a distância entre a fonte de irradiação e a pele dos animais (*Source Skin Distance – SSD*) foi de 50 cm.

3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Na exposição letal ou subletal aguda e de corpo inteiro a SAR pode ser observada. Entre os principais sintomas destacam-se: (1) perda do apetite (anorexia) com conseqüente e rápida perda de massa corporal e retardo no crescimento; (2) alterações hematológicas com queda nos níveis leucocitários (principalmente de linfócitos) e anemia; (3) alterações no metabolismo do fígado,

levando ao aparecimento de disfunções orgânicas importantes e geralmente associadas ao aumento dramático no estresse oxidativo, lesões celulares e teciduais.

Como não foi viável analisar todos os efeitos do suco e irradiação em todos os órgãos dos animais (por questão de limitações de tempo e recursos) a investigação foi concentrada naquelas variáveis classicamente associadas aos sintomas da exposição aguda à radiação. O fígado foi escolhido em função de resultados prévios relatados por Andrade e colaboradores (ANDRADE et al., 2009a, ANDRADE et al., 2009b), onde foi detectada alteração de massa do órgão nos animais irradiados com raios X em condições semelhantes, sem no entanto, poder-se determinar a causa.

Para a realização dos estudos, as seguintes fases dos procedimentos gerais executados podem ser identificadas: **Fase 1:** período de adaptação às condições do biotério por 1 (uma) semana; **Fase 2:** após este período de adaptação foi disponibilizada suplementação alimentar diária com suco ou com solução de glicose/frutose durante 07 dias; **Fase 3:** no 15º dia 50 % dos animais foi exposto à radiação gama; **Fase 4:** durante os 4 dias subsequentes os animais continuaram tendo disponibilizada suplementação de suco ou solução isocalórica e o peso corporal foi avaliado às 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição à radiação gama. **Fases 5 a 7:** após este intervalo, os animais foram submetidos a eutanásia, o peso dos principais órgãos foram medidos e os mesmos armazenados em refrigeração a -40°C para a realização das posteriores análises bioquímicas.

3.7 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO FÍGADO

O sangue foi coletado por vaso-punção do plexo retro-orbital às 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição à radiação gama. Hemograma destas amostras foi realizado a fim de se verificar as variáveis hematológicas do estudo. Foram avaliadas as seguintes variáveis associadas ao estresse oxidativo: (a) fosfatase alcalina, (b) AST, (c) ALT, (d) desidrogenase láctica (LDH), (e) gama glutamiltransferase (GGT), (f) proteínas totais, (g) albumina, (h) uréia, (i) SOD, (j)

catalase, (l) GSH, (m) GSSG, (n) GSH/GSSG, (o) diclorofluoresceína. No ANEXO 1 esta discriminado os métodos e protocolos utilizados em cada parâmetro avaliado.

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram inicialmente plotados em planilha eletrônica Excel e analisados por meio de dois programas estatísticos: GraphPad 5.01 Prisma e SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) conforme o caso. Os dados foram inicialmente analisados segundo a sua distribuição normal por meio de teste de Kolmogorov-Smirnov. Como a distribuição foi normal, as comparações entre os tratamentos foi feita por análise de variância de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão discutidos em mais detalhe os resultados obtidos, bem como outras considerações pertinentes ao estudo incluindo as suas possíveis limitações. Para tanto, os resultados serão discutidos considerando-se as alterações potenciais relacionadas com as alterações metabólicas, relacionadas ou não à SAR, que foram aqui identificadas e investigadas e o efeito da suplementação alimentar com suco de uva.

Dada a impossibilidade, por questões de logística e tempo, de análise de todos os órgãos dos animais, as investigações realizadas foram concentradas no fígado.

4.1 ENZIMAS DO SANGUE

As enzimas são proteínas com propriedades catalisadoras sobre as reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Em geral, a avaliação bioquímica das enzimas no sangue possui como objetivo determinar a existência de lesões celulares que concorreram para o extravasamento destas enzimas para o sangue (MOTTA, 2009). Por meio de uma análise destes exames pode-se ter um marcador clínico capaz de indicar o funcionamento inadequado de determinado órgão.

A figura 4.1A apresenta os medidas da enzima fosfatase alcalina (FA). Os animais irradiados (PI e SI) mostraram uma diminuição nos níveis desta enzima, quando comparados com os respectivos controles (PNI e SNI) ($P < 0,05$). Entretanto, o grupo suplementado com suco e irradiado (SI) mostrou um decréscimo menos acentuado nos níveis desta enzima nos intervalos de 24, 72 e 96 horas após a exposição.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima responsável pela remoção de grupos fosfato a partir de muitos tipos de moléculas, incluindo os nucleotídeos, proteínas e

alcalóides, sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios intestinal e renal. (CAMPBELL et al, 2006). Porém, os hepatócitos respondem pela maior parte da atividade sérica normal da FA. Níveis baixos de desta enzima podem indicar anemia aplástica (MOTTA, 2009). Esta condição foi observada nos animais expostos a radiação e pode ser o resultado de tentativas mal sucedidas de formar novas células sanguíneas. A manutenção de níveis superiores desta enzima no grupo irradiado e suplementado com suco de uva (SI) em comparação com o grupo irradiado e não suplementado (PI), é sugestivo de uma possível ação radiomodificadora positiva da ingestão do suco de uva sobre este parâmetro.

Na figura 4.1B é possível ver o comportamento gráfico da enzima gama glutamil transferase (GGT) que está fisiologicamente envolvida na síntese protéica e peptídica, na regulação dos níveis teciduais de glutatona e transporte de aminoácidos entre membranas (MOTTA, 2009). Esta enzima está envolvida no metabolismo da glutatona e desempenha um papel crítico na defesa antioxidante do organismo (CASTELLANO; MERLINO. 2012). Os dados apresentados na figura 4.1B se mostraram, entretanto, inconclusivos para este indicador, não apresentando diferenças significativas ($P > 0,05$) ao menos no curto período de tempo analisado (96h), embora os grupos não irradiados apresentem valores ligeiramente superiores da enzima, quando comparado ao grupo controle.

O comportamento da enzima desidrogenase láctica (LDH) é mostrado na figura 4.1C. Esta enzima é liberada na corrente sanguínea quando determinados órgãos são lesados. As lesões hepáticas caracterizam-se por uma LDH elevada e dominante (MILLER, 1985). Na figura 4.1C é possível observar um aumento significativo nos níveis de LDH, após a exposição à radiação gama nos animais do grupo PI e SI, quando comparados com os grupos controle (PNI e SNI), sugerindo um efeito da radiação na elevação dos níveis desta enzima. Adicionalmente, foi observada uma imediata modulação da LDH, aparentemente causada pela ação do suco de uva contra danos radioinduzidos, quando comparado com o grupo de PI ($p < 0,05$), 24, 48, 72 e 96h após a irradiação. Um resultado importante a se destacar é a proteção potencialmente oferecida pelo suco aos ratos irradiados e tratados. Provavelmente os efeitos protetores do composto estão relacionados à ação dos flavonóides presentes no suco, que agem como um redutor das espécies reativas de oxigênio induzido pela radiação ionizante. Além disso, a forte atividade *scavenger*

oferecida, possivelmente, pelo seu teor de flavonóides, pode ser incrementada pela capacidade do suco em melhorar o sistema antioxidante. Embora estes resultados estejam na mesma direção de estudos recentes (ANDRADE et al., 2009a, ANDRADE et al., 2009b) que suportam a idéia de que o suco de uva *Vitis labrusca* efetivamente age contra as alterações metabólicas radioinduzidas e provavelmente relacionadas a algum estágio da SAR em ratos, eles estão em uma base *ad hoc* e precisam de mais profundas investigações.

Na figura 4.1D é possível verificar um aumento significativo nos níveis de Aspartato Aminotransferase (AST) após a exposição de animais à radiação gama nos grupos PI e SI, quando comparados com os grupos controle (PNI e SNI) ($P < 0,05$). É possível sugerir também que o consumo do suco de uva atenuou a elevação da AST nos animais SI, quando comparados com o grupo de PI ($P < 0,05$), para todo intervalo de tempo observado. O mesmo comportamento ocorre nos parâmetros da enzima Alanina Aminotransferase (ALT), figura 4.1E. ALT é uma enzima citoplasmática responsável pela metabolização das proteínas e apresenta-se em grande quantidade nas células do fígado (MILLER, 1985). Observa-se também um aumento nos níveis desta enzima após a exposição dos animais à radiação gama nos grupos PI e SI, quando comparados com os grupos controle (PNI e SNI) ($p < 0,05$), onde os dados sugerem que a ingestão do composto também foi capaz de atenuar significativamente a sua ocorrência nos animais do grupo SI, quando comparados com o grupo PI ($p < 0,05$), durante todo o tempo analisado após a irradiação.

A elevação da aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT, respectivamente) indicam lesão hepatocelular com possibilidade de evolução para estado necrótico (COOPER et al, 2007). Alterações nas atividades destas enzimas podem ser atribuídas aos efeitos fisiológicos causados pela interação da radiação ionizante com a membrana celular, mitocôndrias, ou por meio da ação dos radicais livres radioinduzidos. O aumento da atividade da ALT e AST aparente nos resultados encontrados podem estar relacionados com ampla lesão do parênquima do fígado, ocorrendo a libertação subsequente das enzimas. Lesão tissular ou patologia afetando parênquima hepático provocará uma maior liberação das enzimas para a corrente sanguínea (COOPER et al, 2007). No entanto, é possível observar que a ingestão do suco foi benéfico em atenuar os níveis de AST e ALT, o

que sugere algum tipo ação radiomodificadora positiva, provavelmente devido à atividade antioxidante dos compostos fenólicos encontrados no suco da uva negra utilizado

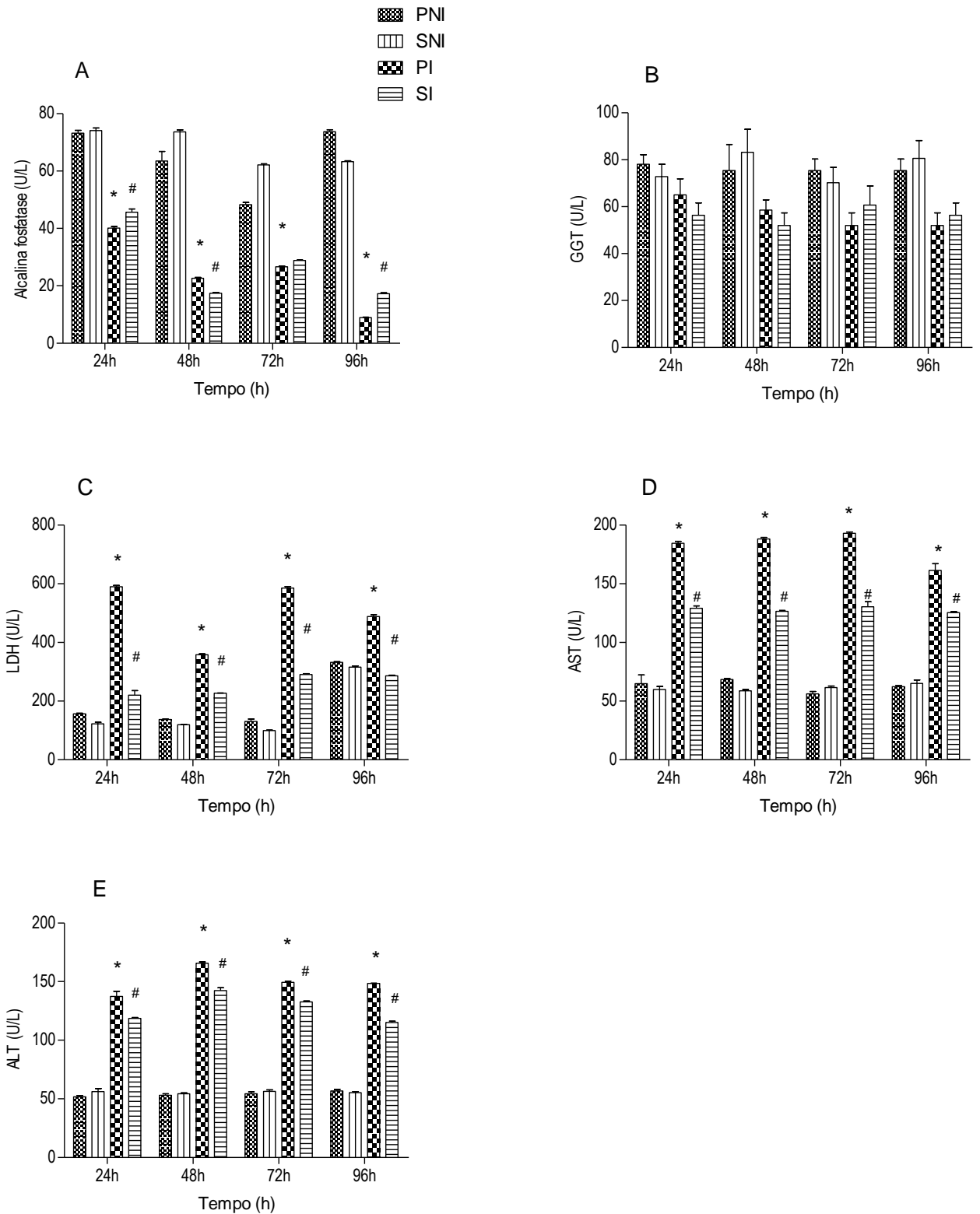


FIG. 4.1 PARAMETROS ENZIMATICOS DE ANIMAIS EXPOSTOS A RADIAÇÃO GAMA. (A) PHOSFATASE ALCALINA, (B) GGT, (C) LDH, (D) AST E (E) ALT. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 5$). PNI, placebo não irradiado; SNI, suco não irradiado; PI, placebo irradiado; SI, suco irradiado. * Diferente do grupo P-NI; # Diferente do grupo PI.

4.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para uma avaliação dosimétrica com objetivos clínicos, pode-se observar o tempo decorrido entre a exposição e a contagem dos hematócritos e hemocomponentes como indicadores biodosimétricos para efeitos da exposição à radiação ionizante. A medida da cinética de depleção dos linfócitos é um bioindicador conhecido e útil (DONS, 1989).

A figura 4.2A mostra o comportamento da medida de hematócritos que corresponde à percentagem de volume ocupada pelos glóbulos vermelhos ou hemácias no volume total de sangue (NAOUM, 1997). Onde é possível observar que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nos animais expostos a radiação nas 24, 48 e 96 horas após a irradiação, corroborando estudos prévios (SHAPIRO & KOLLMANN, 1968; LEE et al, 1988). Entretanto, este indicador não apresentou diferenças significativas ($p > 0,5$) nos animais do grupo SI, no intervalo de tempo analisado.

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de células especializadas da medula óssea, elas têm cerca de 2-3 μm de diâmetro e não possuem núcleo, as plaquetas atuam nas funções estruturais e moleculares da coagulação do sangue (CAMPBELL, 2008). A contagem de plaquetas, figura 4.2B, mostrou um aumento significativo após a exposição dos animais à radiação gama nos grupos PI e SI, quando comparados com os grupos controle (PNI e SNI) ($P < 0,05$). Estes valores elevados são sugestivos de inflamação (MICHELSON, 2007). Entretanto, os resultados encontrados não indicam suficiente ação do suco de uva negra sobre este parâmetro para as doses absorvidas estudadas.

Os leucócitos são células do sistema imunológico envolvidas na defesa do organismo contra doenças infecciosas e materiais estranhos (LAFLEUR-BROOKS, 2008) A figura 4.2C mostra que os efeitos da radiação gama na contagem de leucócitos. Os grupos de animais irradiados (PI e SI) apresentaram um decréscimo significativo na contagem total de células brancas, quando comparados com o respectivo controle (PNI e SNI) ($P < 0.05$) nas 48, 72 e 96 horas após a irradiação. Entretanto os dados não apresentam diferenças significativas nas primeiras 24 horas

após a irradiação, indicando uma dependência temporal para que algum efeito seja observado neste parâmetro.

O linfócito, figura 4.2D, é um tipo de glóbulo branco do sistema imunológico dos vertebrados, são as células que determinam a especificidade da resposta imunológica á microorganismos infecciosos e outras substâncias estranhas. (ABBAS et al, 2003). É previsível uma redução na taxa de contagem de linfócitos, sendo considerado característico para uma exposição radiológica de corpo inteiro potencialmente letal à radiação gama. Estudos neste sentido levaram ao desenvolvimento de um modelo usando a cinética de depleção de linfócitos (curva de Andrew) como uma ferramenta biodosimétrica (BARANOV et al, 1994), o que dá a noção da importância deste parâmetro para a atenção às vítimas potenciais de uma exposição de corpo inteiro à radiação ionizante.

Na contagem de linfócitos apresentados na figura 4.2D, como esperado, os grupos de animais irradiados (PI e SI) apresentaram um decréscimo significativo na contagem total de células brancas, quando comparados com o respectivo controle (PNI e SNI) ($P < 0.05$) nas 48, 72 e 96 horas após a irradiação. Estes resultados apontam para danos maciços na medula óssea como consequência da irradiação aguda de corpo inteiro. Entretanto, os resultados encontrados não indicam suficiente ação do suco de uva negra sobre os parâmetros linfocitários para as doses absorvidas estudadas. Novos experimentos devem ser realizados em diferentes tempos pós-irradiação com células da medula óssea para esclarecer a evolução temporal dos possíveis efeitos radiomodificadores do suco sobre este parâmetro.

Na figura 4.2E verifica-se a contagem de neutrófilos. Os neutrófilos são o tipo mais abundante (40 a 75%) de células brancas do sangue em mamíferos e formam uma parte essencial do sistema imunológico (KLEBANOFF & CLARK, 1978). Os neutrófilos têm um papel crucial como primeira linha de defesa em processos infecciosos e inflamatórios (MILLER, 1985). Observa-se um decréscimo na contagem deste indicador para o grupo PI e SI, quando comparado com o grupo PNI e SNI, para todo o intervalo de tempo observado. Porém não é possível destacar efeitos contundentes que possam ser atribuídos à ingestão do suco de uva sobre este parâmetro, não indicando nenhum efeito radiomodificador deste alimento sobre este parâmetro.

A figura 4.2F mostra a razão neutrófilos/linfócitos. Pode-se verificar que a radiação gama induz uma significativa diminuição nesta razão após 48 e 96 horas após a exposição ($P < 0.05$), mas isto não é observado nas 24 e 72 horas após a exposição. Assim, embora o uso da relação N/L parece normalizar variações inter-individuais em linfócitos e contagem de neutrófilos, a falta de uma dependência temporal na diminuição dos níveis de N/L, durante este trabalho, indica que estudos mais profundos são necessárias para averiguar sobre o real significado deste marcador na radiação.

Juntos, estes resultados sugerem que a radiação gama pode induzir dano nos parâmetros hematológicos. Entretanto, os efeitos do suco de uva sobre estes parâmetros nos animais irradiados observados neste estudo não indicam nenhum efeito radiomodificador contundente deste alimento. Assim, os resultados encontrados não indicam suficiente ação do suco de uva negra sobre os parâmetros hematológicos para as doses absorvidas estudadas e os tempos de coleta de material para análise.

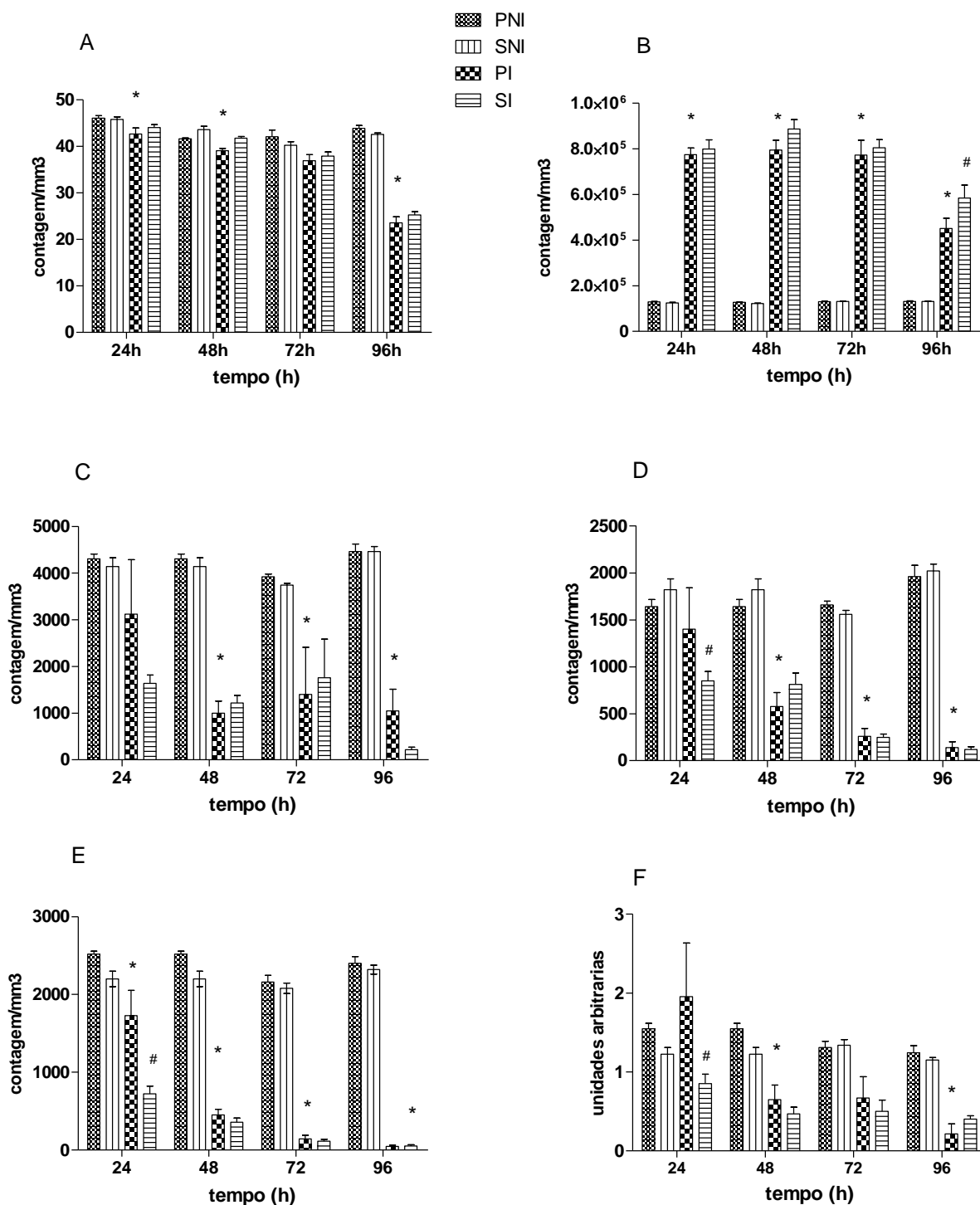


FIG. 4.2 PARAMETROS HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS EXPOSTOS A RADIAÇÃO GAMA. (A) HEMATÓCRITOS, (B) PLAQUETAS, (C) LEUCÓCITOS, (D) LINFÓCITOS, (E) NEUTROFILOS, (F) RAZÃO NEUTROFILOS/LINFÓCITOS. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5). PNI, placebo não irradiado; SNI, suco não irradiado; PI, placebo irradiado; SI, suco irradiado. * Diferente do grupo P-NI; # Diferente do grupo PI.

4.3 METABOLISMO

A figura 4.3A, apresenta o parâmetro proteínas totais, que é a medida da quantidade total de proteínas no sangue. Os grupos de animais irradiados (PI e SI) mostraram uma diminuição significativa dos níveis de proteínas totais quando comparado com o grupo não irradiado (PNI e SNI) ($P < 0,05$) nas 24, e 96, mas não nas 72h. Na interpretação dessas alterações, deve-se avaliar os teores de albumina e de globulina, pois o aumento ou diminuição na concentração de albumina ou globulina provoca alterações detectáveis do conteúdo de proteínas totais (MOTTA, 2009). Na figura 4.3B observa-se o comportamento da albumina que é uma proteína fundamental para a manutenção da pressão osmótica, necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extravascular, localizado entre os tecidos (COOPER et al, 2007), sendo possível verificar que houve um aumento significativo ($p < 0, 05$) nos animais expostos à radiação nas 24, 48 e 72 horas após a irradiação, em discordância com estudos prévios (BHATIA et al, 2004; EL-MISSIRY,2006), onde foi observado um decréscimo nos níveis deste parâmetro em animais expostos a radiação gama. Estes dados indicam um dano no fígado dos animais irradiados (EL-MISSIRY, 2006). Entretanto, há uma tendência a reversão nos níveis de proteínas totais a partir das 96 horas após a irradiação, sugerindo haver uma dependência temporal entre a ação do suco de uva e o tempo de observação.

A uréia é o principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos, tem sua concentração sérica afetada pela dieta e pelo estado de hidratação, constituindo uma indicação grosseira do estado da função renal. (WINDMANN et al, 1987), Os níveis de uréia são mostrados na figura 4.3C, onde é possível observar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração deste parâmetro nos animais expostos à radiação durante o intervalo de tempo analisado após a irradiação, em concordância com estudos prévios (BHATIA et al, 2004; EL-MISSIRY,2006) com ratos irradiados com césio-137 em condições semelhantes. Estes dados sugerem um dano no fígado dos animais irradiados (EL-MISSIRY, 2006). Entretanto, os animais suplementados com suco de uva apresentaram níveis de controle, que é indicativo do sistema antioxidante primário em recuperação ou forte atividade

scavenger oferecida, possivelmente, pelo seu teor de flavonóides (SAADA et al, 2009). Deste modo, pode-se destacar uma possível ação radiomodificadora positiva da ingestão do suco de uva sobre este parâmetro biológico.

A exposição à radiação levou a uma diminuição substancial no peso corporal dos animais, figura 4.3D, quando comparados com os respectivos controles (PI e SI) ($P < 0,05$). Diferentemente dos estudos relatados por Andrade et al 2009a, os efeitos do suco de uva sobre o peso corporal dos animais não mostrou diferenças significativas entre grupos, possivelmente devido ao mais curto intervalo de tempo analisado neste estudo (96 horas) com relação ao trabalho citado (15 dias). Uma das possíveis causas que poderia levar às diferenças observadas no peso corporal também poderia incluir diferenças no consumo médio de água e de ingestão sólida pelos animais (tratados e não tratados). Entretanto, o consumo médio de ingestão sólida, figura 4.3E, e o consumo de água, figura 4.3F, foi o mesmo, afastando variabilidades devidas a possíveis desbalanços energéticos. Portanto, o suplemento de suco de uva observado neste estudo não indica nenhum efeito radioprotetor imediato deste alimento em relação às alterações de consumo alimentar e estados anoréticos.

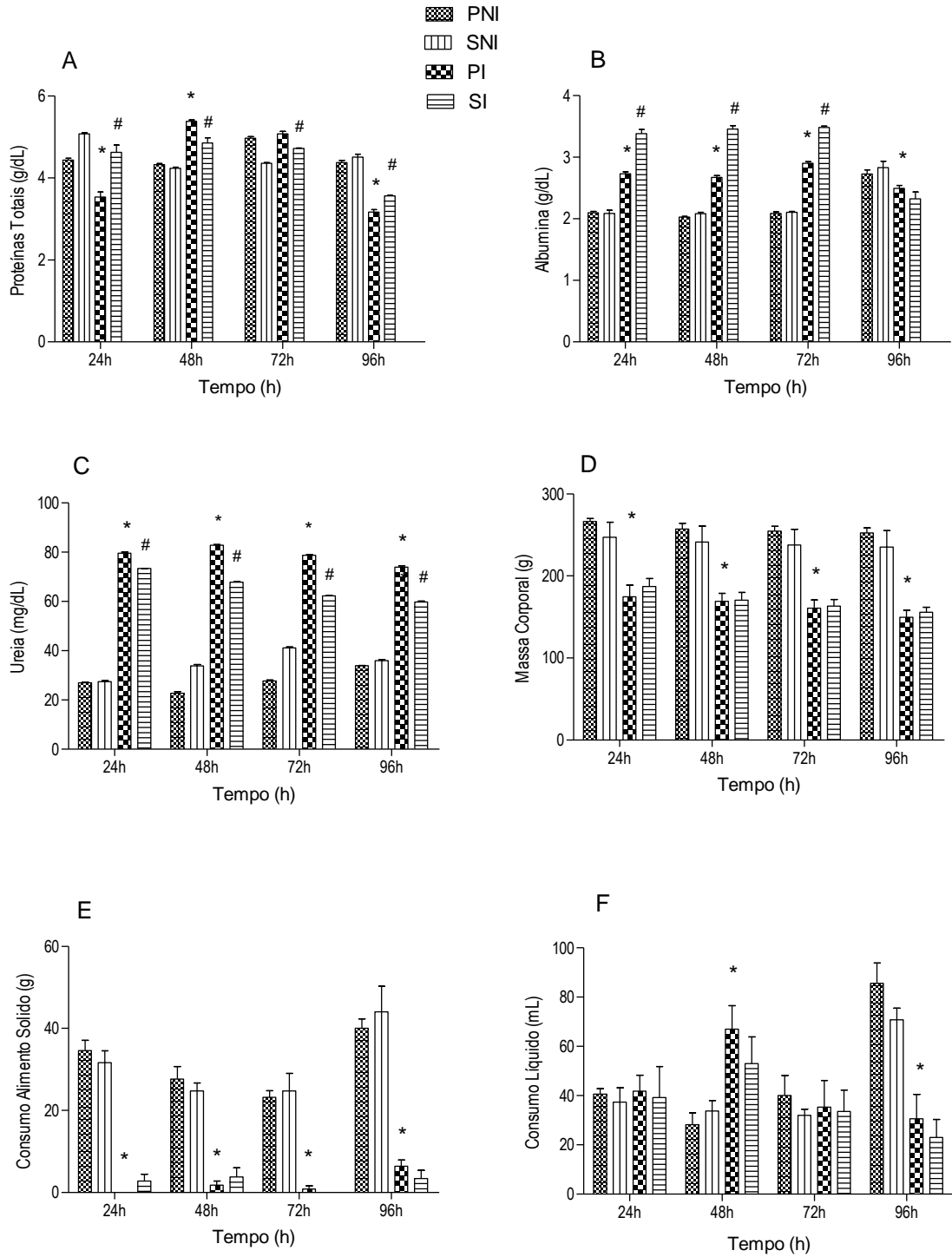


FIG. 4.3 PARAMETROS METABOLICOS DE ANIMAIS EXPOSTOS A RADIAÇÃO GAMA. (A) PROTEÍNAS TOTAIS, (B) ALBUMINA, (C) URÉIA, (D) PESO CORPORAL, (E) CONSUMO ALIMENTAR SÓLIDO, (F) CONSUMO DE LÍQUIDO. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5). PNI, placebo não irradiado; SNI, suco não irradiado; PI, placebo irradiado; SI, suco irradiado. * Diferente do grupo P-NI; # Diferente do grupo PI.

4.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Uma das principais consequências da ação da radiação ionizante sobre células e organismo como um todo, diz respeito ao aumento das espécies reativas de oxigênio, resultando em um estresse oxidativo e dano celular (SAADA, 2008). Os mecanismos de defesa orgânico incluem a prevenção da formação dos radicais livres (antioxidantes preventivos) e das substâncias capazes de neutralizar estes radicais.

Na figura 4.4A é possível observar o comportamento da enzima superóxido dismutase, SOD, que é uma enzima que tem como principal função catalisar o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SAADA, 2008). Foi possível observar uma diminuição nos níveis desta enzima no grupo placebo irradiado (PI) em relação ao grupo controle, sugerindo um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio no ambiente hepático, enquanto o grupo suco irradiado (SI) manteve os níveis do grupo controle, indicando uma possível ação *scavenger* dos polifenóis presentes no suco, uma vez que a quercetina, o principal composto polifenólico presente no suco *Vitis labrusca*, apresenta um alto potencial *scavenger* do radical hidroxila (BEHLING et al, 2004).

Neste estudo, observa-se na figura 4.4B uma diminuição nos níveis da enzima antioxidante catalase nos animais expostos a radiação e que não foram suplementados com o suco de uva. A catalase é uma enzima que catalisa a dismutação do H_2O_2 para formar O_2 e H_2O , sendo muito difícil a enzima ser saturada pelo seu substrato (H_2O_2), e sua atividade catalítica é o principal processo regulador dos níveis intracelulares de H_2O_2 (ANDRADE, 2010). Este resultado está em conformidade com estudos prévios que indicam um decréscimo nos níveis da catalase no intestino de ratos após serem expostos a radiação gama (SAADA et al, 2010) e (HAN et al, 2005) que revela significativas alterações na atividade da catalase no fígado de animais expostos a radiação gama.

O aumento da produção de espécies reativas é geralmente acompanhado pela diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), indicativo de funcionamento do sistema antioxidante natural do organismo no combate aos subprodutos do estresse oxidativo induzido pela radiação (MORALES et al., 1998).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo tiol (-SH) e é substrato para a enzima GPx (ANDRADE, 2010). A GSH tem várias funções, podendo-se citar seu papel no metabolismo atuando como cofactor para a família de enzimas do tipo peroxidase. Está envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, na comunicação intercelular, prevenindo a oxidação e a ocorrência de ligações cruzadas dos grupos -SH de proteínas, da cisteína e coenzima A (CoA) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

Com a análise dos níveis de GSH apresentados na figura 4.4C e GSSG apresentados na figura 4.4D, é possível verificar o estado redox do tecido, pois a GSH converte-se em GSSG pela ação da enzima glutathiona peroxidase utilizando, nesta reação, o peróxido de hidrogênio, assim, na medida em que diminui os níveis de GSH e aumentam os níveis de GSSG há um indicativo de que mais peróxido de hidrogênio está sendo convertido em água neste tecido, em uma tentativa de manter a homeostase.

Ainda, a diminuição da GSH e aumento da GSSG confirmam o aumento das espécies reativas de oxigênio no grupo placebo irradiado PI, mostrando que houve um desequilíbrio na produção destas espécies e o fígado tentou compensar oxidando glutathiona. Estes resultados sugerem que a ingestão do suco favoreceu a redução dos efeitos do estresse oxidativo no fígado, conforme já relatado por (DANI *et al.* 2008; BORBA *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.* 2010).

Resultados para o grupo suplementado com o suco de uva, apresentados na figura 4.4E, apresentam um aumento da razão GSH / GSSG, devido à menor quantidade de GSSG no grupo SI. O suco de uva parece favorecer o aumento da quantidade de GSH intracelular no fígado contribuindo para uma maior eliminação de espécies reativas.

A produção de ERO expressa na geração de peróxido de hidrogênio pode ser monitorada quantitativamente por citometria de fluxo usando o reagente diclorofluoresceína (HASUI *et al.*, 1989). Também foi demonstrado que a oxidação diclorofluoresceína é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio gerado (HIRABAYASHI *et al.*, 1985). Na figura 4.4F verifica-se o comportamento da diclorofluoresceína, cujos níveis elevados indicam estresse oxidativo por meio da produção de espécies reativas de oxigênio. O suco de uva, por meio de seus efeitos antioxidantes foi capaz de reverter a produção de Eros,

Possivelmente devido aos polifenóis presentes no suco, o que lhes confere propriedades antioxidantes (DAVIES et al, 1991).

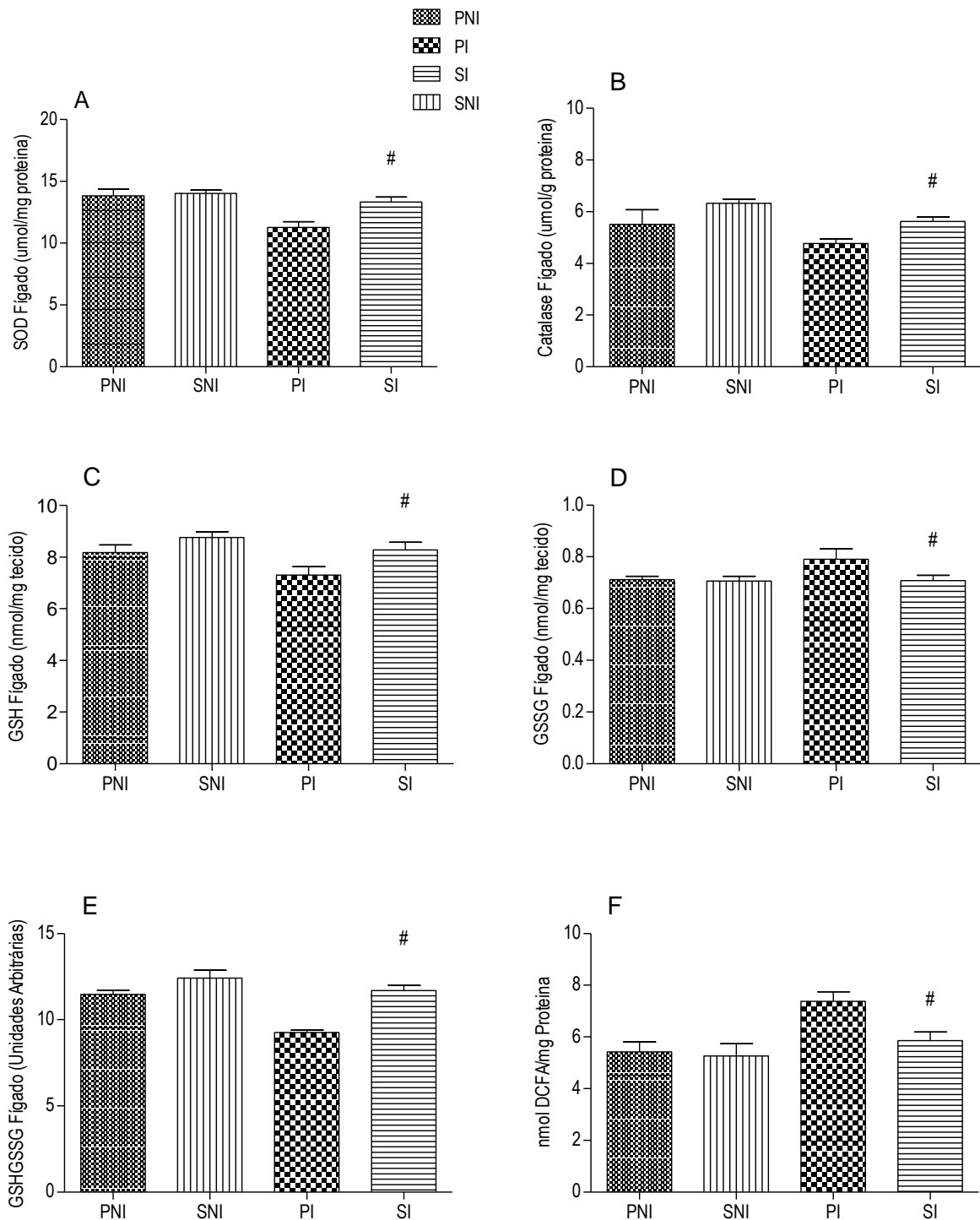


FIG. 4.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE DE ANIMAIS EXPOSTOS A RADIAÇÃO GAMA. (A) SOD FIGADO, (B) CATALASE FIGADO, (C) GSH FIGADO, (D) GSSG FIGADO, (E) GSH/GSSG FIGADO, (F) DICLORO FIGADO. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5). PNI, placebo não irradiado; SNI, suco não irradiado; PI, placebo irradiado; SI, suco irradiado. * Diferente do grupo P-NI; # Diferente do grupo PI.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou *in vivo*, em ratos Wistar, a capacidade radiomodificadora de subprodutos não-alcoólicos da uva orgânica em ratos Wistar irradiados. Pode-se concluir que os resultados indicam que o suco de uva utilizado (*Vitis labrusca*) possui propriedades radiomodificadoras positivas para os efeitos biológicos da radiação, o que concorda com resultados prévios utilizando irradiação de corpo inteiro com raios X e alimentação *ad libitum* com o mesmo suco (ANDRADE, 2010)

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que o suco de uva, assim como no trabalho conduzido por Andrade et al (2010), tem ação antioxidante, possivelmente pela diminuição da peroxidação lipídica sobre o fígado, protegendo-o assim do dano oxidativo, preservando a integridade das funções do tecido e minimizando as desordens metabólicas induzidas pela radiação ionizante.

A figura 4.5 mostra um resumo da análise de todos os parâmetros avaliados, indicando que o suco de uva utilizado (*Vitis labrusca*), parece não haver efeitos expressivos sobre os componentes do sangue. Em função do curto intervalo de tempo analisado apenas os parâmetros relacionados à distribuição de fluídos (albumina) e catabolismo de proteínas (uréia) foram observadas alterações. O sistema antioxidante mostrou-se favorecido pela ingestão do suco em todos os parâmetros analisados.

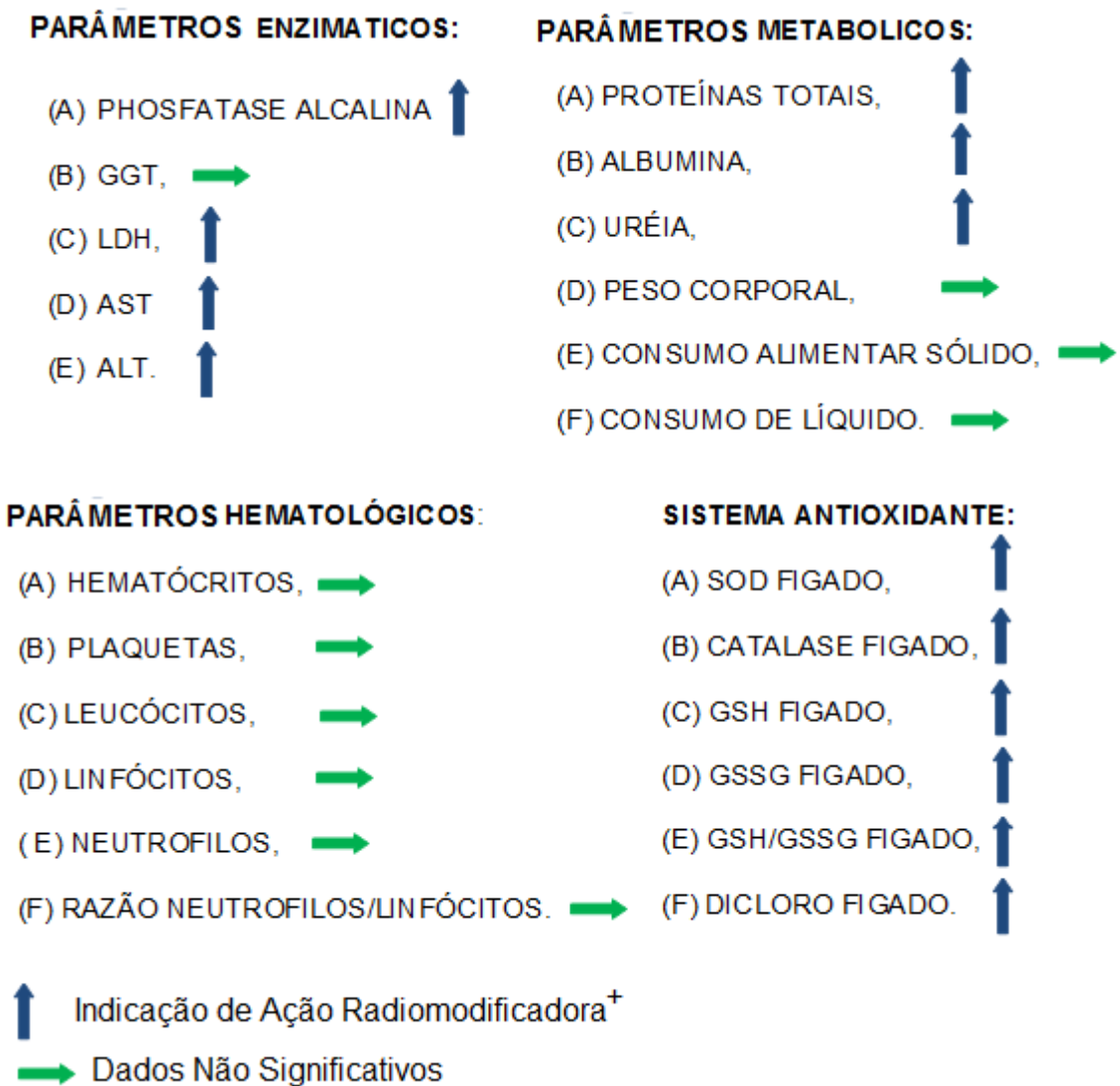


FIG.4.5. Resumo das análises em todos os parâmetros avaliados.

Os resultados obtidos merecem atenção e podem proporcionar melhores condições para pessoas que necessitem enfrentar a exposição à radiação ionizante não apenas para aqueles que se submetem a um tratamento médico como também para aqueles que trabalham na área nuclear.

Certamente, novos e mais completos testes necessitam ser conduzidos, principalmente os relativos à biologia celular e molecular, cuja capacidade de avaliação transcende o escopo deste trabalho. Uma vez realizados, estes resultados poderão responder às questões não contempladas neste trabalho como as referentes à expressão de proteínas importantes para processos apoptóticos (processos de morte programada) e para reparação de danos ao DNA (ácido

desoxirribonucleico), levando à avaliações genéticas e moleculares de importante cunho médico. Os resultados obtidos justificam estudos mais aprofundados sobre as propriedades radiomodificadoras do suco de uva, que podem ser conduzidos em humanos, em condições *ex vivo*.. Confirmando em humanos os resultados positivos apresentados neste trabalho, os achados poderão ter grande impacto positivo em pesquisas endereçadas à pesquisa em saúde humana.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS AK and LICHTMAN AH. **Cellular and Molecular Immunology** (5th ed.). Saunders, Philadelphia. ISBN 0-7216-0008-5, 2003.
- ANDLAUER, W. **Nutraceuticals: a piece of history, present status and Outlook.** Food Research International, v.35, p.171-176, 2002.
- ANDRADE, E.R. **Efeito do suco de uva (*vitislabrusca*, bordô) sobre indicadores fisiopatológicos e bioquímicos da síndrome aguda da radiação em ratos wistar.** Tese de doutorado UFSM, 2010.
- ANDRADE, E.R., BAUERMANN, L. F. **Introdução á Radiobioloia – Conexões Bioquímicas e Biomoleculares.** Ed. UFSM, 2010.
- ANDRADE, E. R., et al. **Effect Of Black Grape Juice Intake On Liver Lipoperoxidation And Body Weight Loss In Whole Body X-Irradiated Rats.** J Med CBR Def, v. 7, p. 1-12, 2009a.
- ANDRADE, E. R., et al. **Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole body X-irradiation in rats .**NutrHosp, v. 24, n.3, p. 297-303, 2009b.
- ALEXI, T.; HUGHES, P.E.; FAULL, R.L.M.; WILLIAMS, C.E. **3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration.** Neuro. Report., R57-R64. 1998.
- BARANOV AE, GUSKOVA AK, NADEJINA NM, NUGIS VY. **Chernobyl experience: biological indicators of exposure to ionizing radiation.** *Stem Cells*; 13 (Supl. 1): 69-77.1994.
- BEHLING, E.B., SENDÃO, M.C., FRANCESCATO, H.D.C.,ANTUNES, L.M.G. and BIANCHI, M.L.P. **Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas.** Alim.Nutr. 15, 285–292. 2004.
- BERGMEYER, HU., **Methods of Enzymatic Analysis**, vol. 9, VCH Publishers, 449-453. 1985.

- BHATTATHIRI, V. N., et al. "**Influence of plasma GSH level on acute radiation mucositis of the oral cavity.**" Int J RadiatOncolBiolPhys 29(2): 383-6,1994.
- BHATIA, A.L., MANDA, K. **Study on pre-treatment of melatonin against radiation-induced oxidative stress in mice.** Environ. Toxicol.Pharmacol. 18, 13–20. 2004
- BIRAL A. R.; **Radiações Ionizantes para médicos físicos e leigos;** editora Insular, São Paulo. 2002
- BITELLI, THOMAZ. **Física e Dosimetria das Radiações.** Rio de Janeiro. Ed. Atheneu. ISBN – 85737984. 2006
- BOLUS, N. E. "**Basic review of radiation biology and terminology.**" J Nucl Med Technol 29(2): 67-73; test 76-7, 2001.
- BORBA, R.F.; ANDRADE, E.R.; BAUERMANN, LF ; ROTHER, F. C .**Black grape juice protects spleen from lipid oxidation induced by gamma radiation in rats.** Journal of Food Biochemistry *JCR*, v. 37, p. 406, 2013.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem 72, 248–54. 1976.
- BROWNE, D., et al. "**Protocol for the treatment of radiation injuries.**" Adv Space Res 12(2-3): 165-8, 1992.
- CASTELLANO I.; MERLINO, A. **γ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications.** Cellular and Molecular Life Sciences.69:3381–3394. 2012.
- CAMPBELL, NEIL A. **Biology** , 8th ed. London: Pearson Education. ISBN 978-0-321-53616-7, 2006.
- CNEN-NE-3.01, **Diretrizes Básicas de Radioproteção**, 2011.
- COOPER, D.,H.; KRAINIK A.J.;LUBNER S.J.;RENO H.E.L.; **The Washington manual - Manual de Terapeutica Clínica** 32ed, Guanabara koogan, Rio de Janeiro. 2007

- DANI C, O. L., PASQUALI MA, OLIVEIRA MR, UMEZU FM, SALVADOR M, MOREIRA JC, HENRIQUES JA. **"Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats."** J Med Food. 11(1): 127-132. 2008.
- DAVIES, K.J.A. **Oxidative damage and repair:** Chemical, biological and medical aspects. Oxford: Pergamon, pp. 910, 1991.
- DAWSON, V.L. e DAWSON, T.M. **Free radicals and neuronal cell death.** Cell. Death and Differentiation, 3, 71-78. 1996.
- DEGER, Y., et al. **"Effects of X-ray radiation on lipid peroxidation and antioxidant systems in rabbits treated with antioxidant compounds."** Biol Trace Elem Res 94(2): 149-56. 2003.
- DENNERY, P.A. **Effects of oxidative stress on embryonic development.** Birth Defects Res. C: Embryo. Today 81, 155–162, 2007
- DONS, R.F. **Triage and treatment of radiation,** TMM Publications, 1989.
- DROGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiol. Rev. 82, 47-95, 2002.
- EBBING D.D; **Química geral,** Edition, 5. Publisher, LTC,.ISBN, 8521611153.1998
- EL-MISSIRY, M.A.; T.A. FAYED, M.R. EL-SAWY, A.A. EL-SAYED. **Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury.** Ecotoxicology and Environmental Safety 66, 278– 286. 2006.
- GIANNI, P.; JAN, K.J.; DOUGLAS, M.J.; STUART, P.M.; TARNOPOLSKY, M.A. **Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle.** Exp. Geront. 39, 1391-1400, 2004.
- GOANS RE, H. E.; BERGER ME; RICKS RC. **Early dose assessment following severe radiation accidents.** Health Phys 72; 513-8. 1997.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. J., **Biol. Chem.,** 751, 1977.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. **Free Radicals and other reactive species in Disease.** Encyclopedia Of Life Sciences & 2001 Nature Publishing Group 1999.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE, JMC **Free radicals in biology and medicine**, 4th edn. Oxford University Press, New York, 2007.

HALL, E. J. **Radiobiology for the Radiologist.** Philadelphia, Lippincott Wilkins & Williams, 2006.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. **Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood.** J. Immunol. Meth., v.117, p.53-58, 1989.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. **A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry.** J. Immunol. Meth., v. 82, p. 253-259, 1985.

ICRP, **ICRP Publications 103**, The 2007 recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Volume 37, ISBN 978-0-7020-3048-2. 2007

IFCC **Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of γ -Glutamyltransferase.** Clin Chem Lab Med; 40:734-38.2002.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997.

KAPLAN, I. **Física Nuclear.** Rio de Janeiro, 1978.

KAUR M, A. C., AGARWAL R. **Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products.** J Nutr, v. 139, n.9, p. 1806S-1812S, 2009.

KAUR M, M. R., AGARWAL R, AGARWAL C. **Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells.** Nutr Cancer, v.60, n. 1, p. 2-11, 2008.

KAPUT, J., J. M. ORDOVAS, et al.. **"The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health."** Br J Nutr **94**(5): 623-632. 2005.

KLEBANOFF, SJ; CLARK, RA **The Neutrophil: Function and Clinical Disorders.** Elsevier/North-Holland Amsterdam. ISBN 0-444-80020-4. 1978.

KNOLL, GLENN F. **Radiation Detection and Measurement.** ISBN – 978-0-470-13148-0. 1989.

LAFLEUR-BROOKS, M. **Exploring Medical Language: A Student-Directed Approach** (7th ed.). St. Louis, Missouri, USA: Mosby Elsevier. ISBN 978-0-323 04950-4, 2008.

LEHNERT, S. **Biomolecular Action of Ionizing Radiation. Medical Physics and Biomedical Engineering.** Montreal, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

LEE TJ, KWON HC, KIM JS, IM SK, CHOI KC. **The Radiation Effect on Peripheral Blood Cell.** *J Korean Soc Ther Radiol*; 6 (2): 253-258. 1988

LEOŠ NAVRÁTIL, J. R. et al. "**Changes in selected parameters of the antioxidant system in radiation damage to the organism.**" *Journal of APPLIED BIOMEDICINE* 6: 195–201, 2008.

LEIFERT WR, A. M. **Cardioprotective actions of grape polyphenols.** *Nutr Res*, v. 28, n. 11, p. 729-37, 2008.

LLÓPIZ N, P. F., CÉSPEDES E, AROLA L, ARDEVOL A, BLADÉ C, SALVADÓ MJ. "**Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress .**" *J Agric Food Chem.* 52(5): 1083-1087. 2004.

MAZZILLI B. P et al **Noções Básicas de Proteção Radiológica.** Institutos de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2002

MEIRELLES GC, S. J., CHAGAS PO, MOURA AP, PINHEIRO AL. **A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third degree burns: a histological study in rats.** *Photomed Laser Surg*, v. 26, n. 2, p. 159-166, 2008.

MENG, X., P. MALIAKAL, et al. "**Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice.**" *J Agric Food Chem* **52**(4): 935-942. 2004.

- MILLER, Otto. **Laboratório para o clínico**, 5ed, livraria atheneu, São Paulo, 1985.
- MICHELSON, A. D. **Platelets**. Amsterdam ; Boston, Academic Press/Elsevier. 2007.
- MORALES, F., COLLA, LM. "**Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde.**" Revista Eletrônica de Farmácia Vol 3(2): 109-122. 2006
- MOTTA, VALTER T. **Bioquímica clínica para laboratórios – Principios e Interpretações**. Editora Medbook. I.S.B.N.: 9788599977354, 2009
- MULLER, H. J. **Artificial Transmutation of the Gene**. Science 66(1699): 84-87, 1927.
- NAOUM, PAULO CESAR. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Sarvier. São Paulo, 1997.
- OKUNO, EMICO. **Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios**. Ed. Harbra. São Paulo. I.S.B.N.: 978-85-294-0339-8. 2007
- RAO, N. M. **Medical Biochemistry**, New Age International (P) Limited, Publishers New Delhi – 2006.
- RAPAPORT, Samuel L., **Hematologia: introdução**, Editora Roca, São Paulo, 1990.
- ROY, A. V.: **Clin. Chem.** 16:431, 1970.
- SAADA, H. N., U. Z. SAID, et al. **Grape seed extract Vitisvinifera protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats**. Phytother Res, v.23, n. 3, p. 434-438, 2009.
- SANTOS, N. S. J; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M.A.; CUPPARI, L. **Serum albumin as nutritional marker of hemodialysis patients**. Rev. Nutr., Campinas, 17(3):339-349, 2004.
- SAPORA, O. et al. "**Relationships between cell killing, mutation induction and DNA damage in X-irradiated V79 cells: the influence of oxygen and DMSO.**" Int J Radiat Biol 60(3): 467-82, 1991.

SHAPIRO, B., KOLLMANN, G., **The nature of the membrane injury in irradiated human erythrocytes, Radiât. Res.** 34 335-346. 1968

SMART R. C., HODGSON E. **Molecular and biochemical toxicology.** – 4th ed.A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2008.

SUPPLEE, H. et al. "**Enlargement of the liver in Sprague-Dawley rats following whole-body x-irradiation.**" Am J Physiol 185(3): 583-8, 1956.

SZASZ, G., **Clin., Chem.,** , 15, 124 – 136. 1969

TAUHATA, L. et al. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos.** Rio de Janeiro, Instituto de Radioproteção e Dosimetria, 2006.

TIMBRELL, J. **Principles of biochemical toxicology,** 3^a ed, London: Taylor & Francis, SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp.Physiol. 82, 2000.291-295. 1997.

TSOULFANIDIS, N. **Measurement And Detection Of Radiation,** McGraw HillBook Company, 1995.

UDENIGWE, C. C., V. R. RAMPRASATH, et al. "**Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy.**" Nutr Rev66(8): 445-454. 2008.

XAVIER, A. M.; MORO J. T.; HEILBRON P. F.; **Princípios Básicos De Segurança e Proteção Radiológica.** Terceira Edição Revisada. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006

YADAV, M., S. JAIN, et al. "**Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update.**" J Med Food 12(3): 473-484. 2009.

WILLIAMS, R. J., SPANCER, J. P., **Flavonoids: antioxidants or signaling molecules.** Free RadicBiol Med. 36:838-49. 2004.

7 ANEXO

7.1 PROTOCOLOS E MÉTODOS UTILIZADOS

7.1.1 DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA.

Por meio do método Roy Modificado (ROY, 1970). A Fosfatase Alcalina presente na amostra hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico, em um tempo pré-determinado de 10 minutos. A atividade enzimática é proporcional à quantidade de timolftaleína formada, que é medida colorimetricamente. Com a adição do Reagente de Cor, a reação enzimática é inativada e a timolftaleína adquire cor azul. Como o substrato e o produto da reação apresentam cores diferentes, em meio alcalino, a coloração final é constituída por uma mistura de cores. A leitura é feita no espectrofotômetro em 578 nm, através de kit comercial (Bioclin).

7.1.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALT E AST

A atividade das enzimas aspartato (AST) e alanina (ALT) aminotransferase, no plasma, serão utilizadas para confirmar o dano hepático causado pelo paracetamol, através de kit comercial (Bioclin).

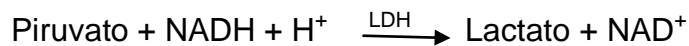
O princípio do teste consiste na reação catalisada pelas enzimas AST e ALT tem como produto a formação de oxaloacetato e piruvato, respectivamente, ambos reagem na presença de NADH oxidando-o à NAD⁺. A velocidade da oxidação em 340 nm é proporcional a presença das enzimas no plasma.

7.1.3 DETERMINAÇÃO DESIDROGENASE LÁTICA

Na metodologia de teste cinético, kit Bioclin LDH UV, A Desidrogenase Láctica (LDH) catalisa a redução do Piruvato com o NADH, obtendo-se Lactato e NAD⁺. A concentração catalítica se determina a partir da velocidade de decomposição do NADH, medida pela queda da absorvidade a 340 nm.

O método cinético baseia-se na absorvidade molar e, por essa razão, as leituras devem ser realizadas em um espectrofotômetro que cumpra as seguintes

condições: Comprimento de onda 340 nm, Semi trajetória da banda de passagem 10 nm, Luz espúria menor que 0,5%, Cubeta de 1 cm termostaticada.



7.1.4 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA GAMA GT

A metodologia Szasz Modificado (SZASZ, 1969), padronizado pela IFCC, (2012). Baseia-se na IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), no qual a γ -Glutamilttransferase catalisa a transferência do radical Glutamil do substrato para a Glicilglicina formando γ -Glutamilglicilglicina e 5-Amino-2-Nitrobenzoato. A velocidade de formação da 5-Amino-2-Nitrobenzoato em 405 nm é proporcional à atividade da enzima.



7.1.5 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

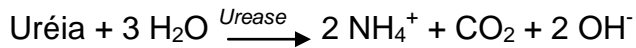
O conteúdo protéico é determinado segundo o método proposto por Bradford 1976 usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com os ions cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das Proteínas no meio. A presença do Tartarato de Sódio e Potássio estabiliza o reagente e a concentração adequada de Iodeto de Potássio previne a sua auto-redução.

7.1.6 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA ALBUMINA.

No método Verde de Bromocresol. A dosagem utiliza o que se chama “erro protéico dos indicadores”. Em presença da Albumina, o Verde de Bromocresol forma um complexo corado, que exhibe um espectro de absorção diferente do corante no seu estado livre, permitindo, assim, a dosagem da Albumina.

7.1.7 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA URÉIA

A Uréia é hidrolisada a íons Amônio e CO₂, pela Urease. Através do método Enzimático Colorimétrico (BERGMEYER, 1985). Em pH alcalino e na presença de Salicilato e Hipoclorito de Sódio, a Amônia origina um composto esverdeado, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de Uréia na amostra analisada. A leitura é feita no espectrofotômetro em 600 nm.



7.1.8 ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Atividade da SOD será determinada pelo método baseado na capacidade da SOD em inibir a autooxidação da adrenalina para adrenocromo. Resumidamente, a fração sobrenadante será adicionada em um meio contendo tampão bicarbonato-carbonato (50 mM, pH 7,2) e adrenalina (0,4 mM). A análise cinética da SOD terá início após adição da adrenalina e será mensurada em 480 nm.

7.1.9 ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)

Atividade da Catalase será determinada pela decomposição de H₂O₂. Resumidamente, alíquotas do homogenado serão adicionadas a um meio contendo tampão Fosfato de K⁺ (50 mM, pH 7,4) e H₂O₂ (10 mM). A análise cinética da catalase iniciará após adição de H₂O₂ e a decomposição deste monitorada espectrofotometricamente em 240 nm.

7.1.10 NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E GLUTATIONA OXIDADA (GSSG)

Este método baseia-se no princípio que a GSH reage especificamente com o orto-ftalaldeído (OPT) em pH 8.0 resultando em produto fluorescente e, para determinação da GSSG, na ligação do n-etilmaleimida à GSH, impedindo sua oxidação (350 nm de excitação e 420 nm de emissão) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007);

7.1.11 MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DA DICLOROFLURESCEÍNA

A produção de espécies reativas de oxigênio será determinada pelo corante fluorescente Diclorofluoresceína (DCFH). O método baseia-se na deacetilação do sonda (DCFH-DA) e subsequente oxidação pelas espécies reativas da oxigênio, formando um composto altamente fluorescente (HALLIWELL AND GUTTERIDGE 2007). A fração sobrenadante do fígado foi adicionada a um meio contendo TRIS-HCl (10mM; pH7.4) e DCFH-DA (1mM). Após, o meio foi incubado por 1h e a fluorescência foi medida em 488nm de excitação e 525nm de emissão. Os resultados foram determinados usando uma curva padrão e corrigidos por quantidade de proteína.