

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**



O efeito da infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* Arruda sobre ratas gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência

**Juliana Becker Borba
Orientadora: Jenifer Saffi**

Porto Alegre, 2010.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

O efeito da infusão de *Hibiscus pernambucensis* Arruda sobre ratas gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência

Juliana Becker Borba

Orientadora: Jenifer Saffi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia desta Universidade e no Laboratório do Programa de Pós-Graduação Profissional em Genética e Toxicologia Aplicada da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA.

Ser pesquisador...

É ultrapassar todos os limites;
É não contentar-se por completo;

É desvendar o desconhecido;
É um contentamento descontente;
É um tudo querer sem nada ter;

É querer estar preso por vontade;
É se esmerar pela perfeição em um caminho tortuoso;
Se tão contrário a si é mesmo o pesquisador?

Luis Vas de Camões adaptada por Juliana Becker Borba

Dedico este trabalho aos meus pais por me darem a base do conhecimento e a meu esposo Orlando pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado e colega de laboratório Orlando, por ter paciência às minhas teimosias e por estar sempre ao meu lado com muito carinho, incentivo e amor.

A minha orientadora Jenifer Saffi, pela serenidade, exemplo de profissional e também por acreditar neste trabalho depois de vários percalços.

Ao professor João Antônio Pêgas Henriques, pelos seus conhecimentos, dicas e incentivos nos momentos difíceis do projeto.

À comissão de acompanhamento os professores Célia Regina Carlini e Carlos Termignioni pela atenção e motivação.

Ao professor Guido Lenz, por ajudar no estoque das amostras biológicas no seu ultra-freezer.

Ao professor Augusto Schrank e a professora Marilene Henning Vainstein, pela amizade, incentivo e empréstimo de alguns equipamentos.

Ao professor Arthur Germano Fett Neto e seus alunos Carolina Ruedell e Diogo Porto, pela orientação nas técnicas de polifenol total e flavonóides.

À professora Mara Rejane Ritter do Inst. Botânica da UFRGS, pela sua atenção, dedicação e ajuda na excicata do Hibiscus.

À técnica de biotério Dona Zelma do Departamento de Biofísica da UFRGS, pelo auxílio nos trabalhos de biotério.

Às estagiárias de iniciação científica Tatiana Maraschin e Larissa Milano Souza, pela colaboração e dedicação.

Aos colegas do laboratório 219 e 210, pela compreensão, atenção e ajuda em acrescentar conhecimentos ao projeto.

À secretária Silvia do PPGBCM, pela simpatia, carinho, atenção e boa vontade em ajudar sempre, durante todo esse tempo que passei na pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1.INTRODUÇÃO	
1.1 Família <i>Malvaceae</i>	2
1.1.1 <i>H. pernambucensis</i> Arruda.....	4
1.1.2 Diferenças entre <i>Hibiscus tiliaceus</i> Linn e <i>Hibiscus pernambucensis</i> Arruda.....	6
1.2 Campo Eletromagnético	12
1.3 Radicais Livres em Sistemas Biológicos.....	14
1.3.1 Bioquímica das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	16
1.3.2 Danos Oxidativos às Proteínas.....	20
1.3.3 Peroxidação Lipídica	21
1.3.4 Danos ao DNA.....	23
1.3.5 Antioxidantes.....	25
1.4 Polifenóis Totais.....	27
1.4.1 Flavonóides.....	28
2.OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral	31
2.2Objetivos Específicos	31
3.MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais.....	32
3.2 Aspectos Éticos.....	32
3.3 Delineamento do Estudo.....	32
3.4 Coleta, procedimento e armazenamento das flores de <i>H.pernambucensis</i>	33

3.5	Preparação e administração da infusão das flores de <i>H. pernambucensis</i>	34
3.6	Administração.....	34
3.7	Medidas do Conteúdo de Polifenóis Totais.....	34
3.8	Medição do Conteúdo de Flavonóides.....	35
3.9	Medidas da peroxidação lipídica pelo método de TBARS – Substância Reativa com Ácido Tiobarbitúrico.....	36
3.10	Danos oxidativos às proteínas.....	38
3.11	Avaliação da genotoxicidade pelo Ensaio Cometa.....	39
3.12	Análises Estatísticas.....	41
4.	RESULTADOS	
4.1	ANÁLISES DO ESTRESSE OXIDATIVO	
4.1.2	MEDIDA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	43
4.1.2.1	Córtex Cerebral Direito.....	44
4.1.2.2	Córtex Cerebral Esquerdo.....	45
4.1.3	DETERMINAÇÃO DE CARBONIL NO CÓRTEX CEREBRAL ESQUERDO.....	46
4.2	ANÁLISES DA GENOTOXICIDADE NO CÓRTEX CEREBRAL ESQUERDO POR ENSAIO COMETA.....	47
4.2.1	Freqüência de danos do Ensaio Cometa por classes de danos.....	48
4.3	CONTEÚDOS DE POLIFENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES.....	50
5.	DISCUSSÃO.....	51
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8.	APÊNDICE	
	Effects of chronic exposure to electromagnetic field of Ultra High Frequency 950 MHz on the right and left cerebral cortex of rats exposed during pregnancy and lactation.....	76
	CURRICULUM VITAE.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- AlCl₃** - cloreto de alumínio
- BHT** - butilhidroxitolueno
- CCD** - córtex cerebral direito
- CCE** - córtex cerebral esquerdo
- CEM** - campo eletromagnético
- CEMUAF** - campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência
- DNFH** - 2,4-dinitrofenilhidrazina
- ER** - espécies reativas
- ERB** - estação rádio base
- ERO** - Espécies Reativas de Oxigênio
- FD** - Frequência de Danos
- GPx** - Glutathione-Peroxidase
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- H₃PO₄** - ácido fosfórico
- HCl** - ácido clorídrico
- HpA** - *Hibiscus pernambucensis* Arruda
- HrsL** - *Hibiscus rosa-sinensis* Linn
- HsL** - *Hibiscus sabdariffa* Linn
- HtL** - *Hibiscus tiliaceus* Linn
- ID** - Índice de Danos
- LOO·** - radical peroxil
- LOOH** - radical hidroperóxido
- MDA** - malonaldeído
- Na₂CO₃** - carbonato de sódio
- NaNO₂** - nitrato de sódio
- NaOH** - hidróxido de sódio
- O₂·⁻** - radical superóxido
- O₂²⁻** - radical peróxido
- OH⁻** - ânion hidroxila
- OH** - radical hidroxil
- PC** - proteínas carboniladas

PUFA - ácido graxo poliinsaturado

RC - rata controle

RCH - ratas controles que tomaram a infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* Arruda.

RE - ratas expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência.

REH - ratas expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta freqüência que tomaram a infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* Arruda.

SAR - Taxa de Absorção Específica

SOD - superóxido dismutase

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico

UHF – Ultra-Alta-Freqüência

t-BHP – tert-butil-hidroperóxido

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Partes aéreas de *H. pernambucensis* Arruda.

Figura 2. Flor de *H. pernambucensis* Arruda.

Figura 3. Flor de *Hibiscus pernambucensis* Arruda.

Figura 4. Flor de *Hibiscus tiliaceus* Linn.

Figura 5. Comparação das flores e estigmas de *H.tiliaceus* Linn (T) e de *H. pernambucensis* Arruda (P).

Figura 6. Diferenciação genética de *H. tiliaceus* e suas espécies aliadas.

Figura 7. Espectro eletromagnético.

Figura 8. Fontes e respostas celulares as espécies reativas (ER).

Figura 9. Danos oxidativos a macromoléculas biológicas.

Figura 10. Propagação da peroxidação lipídica.

Figura 11. ERO e danos em DNA.

Figura 12. Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes.

Figura 13. Representação esquemática dos flavanóis, flavonóis e isoflavonas, principais subclasses dos flavonóides

Figura 14. Estrutura básica dos flavonóides.

Figura 15. Reação de malonaldialdeído com o Ácido Tiobarbitúrico (TBA).

Figura 16. Mecanismos de formação do grupo carbonila.

Figura 17. Metodologia do Ensaio Cometa.

Figura 18. Células do Ensaio Cometa coradas com nitrato de prata. a) classes 0 e 1; b) classes 2 e 3; c) classe 4.

Figura 19. Determinação de peroxidação lipídica de fígado das RC, RE, RCH e REH ao CEMUAF.

Figura 20. Determinação de peroxidação lipídica de CCD das RC, RE, RCH e REH ao CEMUAF.

Figura 21. Determinação de peroxidação lipídica do CCE das RC, RE, RCH e REH ao CEMUAF.

Figura 22. Determinação de proteínas carboniladas do CCE das RC, RE, RCH e REH ao CEMUAF.

Figura 23. Determinação da frequência de danos pelo Ensaio Cometa em CCE das RE e RC ao CEMUAF.

Figura 24. Determinação da frequência de danos pelo Ensaio Cometa em CCE das REH e RCH ao CEMUAF.

Tabela 1. Determinação do Índice de danos pelo Ensaio Cometa em CCE das RE, RCH e REH ao CEMUAF.

Tabela 2. Determinação de Polifenóis Totais e Flavonóides das infusões das flores de *H. sabdarifa*, *H. rosa-sinensis* e *H. Pernambucensis*.

RESUMO

O *Hibiscus pernambucensis* Arruda (*HpA*) é uma planta da família Malvaceae, típica de clima tropical de ecossistemas de mangues. A infusão das flores do *HpA* apresenta propriedades antioxidantes, decorrentes da vitamina E, flavonóides, quercetina e taninos. Há estudos mostrando que os campos eletromagnéticos de ultra-alta-freqüência (CEMUAF) podem provocar danos à saúde. Estes danos acontecem por indução de estresse oxidativo às células. O presente estudo visa verificar o efeito antioxidante das flores de *HpA* sobre o fígado e o córtex cerebral de ratas expostas aos CEMUAF durante a gestação e a lactação. Foram utilizadas 24 ratas fêmeas Wistar de 3 meses de idade que foram divididas em 4 grupos: 6 ratas controles (RC), 6 ratas expostas (RE), 6 ratas controles (RCH) e 6 ratas expostas (REH) que tomaram a infusão das flores de *HpA*. Foi administrada diariamente 1,5ml da infusão, em uma concentração de 5%, 30 min antes da exposição, durante 42 dias. As REH foram irradiadas 30 min por dia, por toda gestação e lactação, em uma freqüência de 950MHz, 1W de potência, campo elétrico médio de 35 V/m e antena de polarização vertical. A taxa de absorção específica do grupo exposto variou de 0,64 a 0,44W/kg no cérebro e de 0,99 a 0,67W/kg no fígado, estes valores foram calculados para ratas variando de 90 a 132 dias de idade. Após este tempo, as ratas foram decapitadas, o fígado e córtex cerebral foram retirados e imersos no nitrogênio líquido para posterior análise. Os resultados mostraram que a exposição ao CEMUAF e a infusão de *HpA* causaram um aumento significativo do dano oxidativo em lipídios e DNA no córtex cerebral esquerdo (CCE) ($p < 0,05$). Nossos resultados indicam que o CEMUAF de 950MHz e a infusão de *HpA* provocam estresse oxidativo e é genotóxico ao CCE de RE e RCH. Quando combinado CEMUAF e a infusão, houve diminuição dos danos em DNA no REH. Nas análises quantitativas de conteúdo de polifenol total e flavonóides, observou-se que a infusão de *HpA* contém uma grande quantidade de polifenóis totais mas uma pequena de flavonóides (quando comparado ao *H.sabdariffa*) o que não foram capazes de diminuir os danos oxidativos nos animais.

ABSTRACT

The *Hibiscus pernambucensis* Arruda (*HpA*) is a plant of the Malvaceae family, typical of tropical mangrove ecosystems. The infusion of the flowers of the *HpA* has antioxidant properties, resulting from vitamin E, flavonoids, quercetin and tannins. There are studies showing that electromagnetic fields of ultra-high frequency (UHF-EMF) can cause damage to health. These damages occur by induction of oxidative stress to cells. This study aims to determine the antioxidant effect of the flowers of *HpA* on the liver and cerebral cortex of rats exposed to UHF-EMF during pregnancy and lactation. Twenty-four female Wistar rats of average age three months were distributed into four groups: 6 control rats (CR), 6 exposed rats (ER), 6 control rats (HCR) and 6 exposed rats (HER). The animal received on daily basis an amount of 1,5 ml of the infusion of flowers *HpA*, at a concentration of 5%, 30min before exposure, for 42 days. The ER were irradiated 30 minutes per day throughout pregnancy and lactation, at a frequency of 950MHz, 1W of power, the average electric field of 35V/m and antenna for vertical polarization. The specific absorption rate of the exposed group ranged from 0.64 to 0.44W/kg in the brain and from 0.99 to 0.67W/kg in the liver. These values were calculated for rats ranging from 90 to 132 days of age. After this time, the rats were decapitated, the liver and cerebral cortex were removed and immersed in liquid nitrogen for later analysis. The results are presented as mean \pm SEM. The values were assessed by post-ANOVA SNK (two tails), with the significant results $p < 0,05$ for $n=6$. The results showed that exposure to UHF-EMF and the infusion of *HpA* caused a significant increase in oxidative damage in lipids and DNA in the left cerebral cortex (LCC) ($p < 0,05$). The results indicate that UHF-EMF of 950MHz and the infusion of *HpA* cause oxidative stress and is genotoxic to LCC ER and HCR. When combined UHF-EMF and infusion decreased DNA damage in the HER. Quantitative analysis of total polyphenol content and flavonoids showed that the infusion of *HpA* contains a large amount of total polyphenols but little of flavonoids (compared to *H.sabdariffa*) which have not been able to reduce oxidative damage in animals.

1. INTRODUÇÃO

Há cerca de 65 milhões de anos com a irradiação do cretáceo, as angiospermas tornaram-se dominantes na Terra, constituindo o maior grupo de plantas (RAVEN *et al.*, 2007; SADAWA *et al.*, 2009). Em 2500 a.c, os médicos egípcios começaram a utilizar as plantas para fins terapêuticos, tornando-as domesticadas e fáceis de serem manuseadas e empregadas na medicina popular (CUNHA, 2007).

Nos dias de hoje, há vários medicamentos industrializados que são feitos a partir de princípios ativos de plantas, com base nas informações populares. Um exemplo disso é o ácido-salicílico (AAS) e, mais recentemente, a *Artemisia annua* (um antimalárico isolado de *Artemisia annua*) (QUITÉRIO, 2006).

Essa biodiversidade dos vegetais constitui um importante tesouro científico e apenas 1% das espécies vegetais conhecidas foram estudadas (FOGLIO, 2006). A fitoterapia está bem difundida, principalmente por utilizar matérias-primas vegetais que são largamente empregadas em farmácias de manipulação e estabelecimentos de produção industrial (JÚNIOR & PEREIRA, 2009). A comprovação da ação biológica e da toxicidade ao ser humano são preocupações usuais da comunidade científica, no que diz respeito ao uso de novas espécies vegetais como medicamentos (JÚNIOR & PEREIRA, 2009). Neste sentido, a pesquisa na área de plantas exerce um papel fundamental, tanto na descoberta dos princípios ativos de importância biológica como nas análises toxicológicas, que possam garantir, de forma segura, o seu uso na saúde humana (FOGLIO, 2006).

Segundo LOPES *et al.* (2005), elementos presentes em plantas da dieta humana, podem ser usados tanto medicinalmente como podem apresentar princípios ativos nocivos ao organismo.

Diante do exposto, as espécies do gênero *Hibiscus* utilizadas na medicina popular, com fins profiláticos e curativos de infecções e inflamações, compreendem um grande grupo de plantas medicinais. Elas podem ser reconhecidas pelas suas aplicações terapêuticas e farmacológicas (MAGANHA,

2009). Desta maneira, existe o interesse em estudar a atividade antioxidante da espécie *Hibiscus pernambucensis* Arruda.

1.1 Família *Malvaceae*

A família *Malvaceae* Juss é constituída por 75 gêneros e 1500 espécies, tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrada predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (CRAIG *et al.*, 2006).

O gênero *Hibiscus* é o maior da família *Malvaceae*, sendo constituído por cerca de 220 espécies (TSENG & LEE, 2006). Existe uma grande variedade, dentre elas, árvores, arbustos e ervas. Têm importância econômica, como produtoras de fibras têxteis, ornamentais, fornecedoras de madeiras e são utilizadas na medicina popular (CRAIG *et al.*, 2006). Menos de 15 espécies foram estudadas por seus efeitos biológicos. Recentemente, a composição fitoquímica e os principais efeitos farmacológicos do gênero *Hibiscus* foram revisados por MAGANHA *et al.* (2009). As espécies mais pesquisadas para fins fitoterápicos são *Hibiscus rosa-sinensis* Linn e *Hibiscus sabdariffa* Linn. Outras espécies de *Hibiscus* vêm sendo estudadas, tais como *Hibiscus cannabinus* Linn, *Hibiscus esculentus* Linn, *Hibiscus macranthus* Linn, *Hibiscus tiliaceus* Linn e *Hibiscus pernambucensis* Arruda.

Hibiscus rosa-sinensis Linn é um arbusto bem estudado, conhecido popularmente como rosa-da-china ou graxa-de-estudante. O extrato da planta possui quercetina, caroteno, niacina, riboflavina, ácido malvático e ácido láurico (ROSS, 1999). A presença da antocianina nas pétalas da planta tem efeito de proteção contra os danos oxidativos provocados por tetra cloreto de carbono no fígado de ratos (OBI *et al.*, 2001). As flores têm ação diurética (SCHIMIZU *et al.*, 1993), anti-espermatogênica e androgênica (REDDY *et al.*, 1997), anti-tumoral (SERRAME *et al.*, 1995), anticonvulsivante (KASTURE *et al.*, 2000) e anti-diabética (ALAM *et al.*, 1990). Além disso, um estudo realizado por SACHDEWA *et al.* (2003) utilizando o extrato etanólico das flores mostrou que houve uma redução de 46% da glicose no sangue de ratos. O uso do extrato etanólico das flores também provocou hipocolesterolemia e hipotrigliceridemia em ratos machos

(SACHUDEWA & KHEMANI, 2003). No extrato hidroalcolico das flores foi visto ação anti-hipertensiva (SIDDIQUI *et al.*, 2006) e anti-estrogênica (KHOLKULE *et al.*, 1976).

Hibiscus sabdariffa Linn é extensivamente pesquisado tanto *in vivo* como *in vitro* (OLVERA-GARCÍA *et al.*, 2008). É conhecido popularmente como roselle e karkadé (JULIANI *et al.*, 2009). O extrato etanólico das flores apresenta componentes antioxidantes como vitamina E e C, ácidos polifenólicos, flavonóides, antocianinas (WANG *et al.*, 2000), ácido protocatênico (KAO *et al.*, 2009), vitamina A, carotenóides e ácido linoléico (OLVERA-GARCÍA *et al.*, 2008). A infusão das flores provoca diminuição de colesterol no soro de humanos (LIN *et al.*, 2007) e de animais (HIRUNPANICH *et al.*, 2006), protege o fígado contra o dano oxidativo (LIU *et al.*, 2006), diminuindo a peroxidação lipídica e a lesão no fígado (KAO *et al.*, 2009). Tem capacidade antioxidante (CHEN *et al.*, 2004) e exhibe efeito anti-hipertensivo e cardioprotetor (ODIGIE *et al.*, 2003; AJAI *et al.*, 2007; HERRERA-ARELLANDO *et al.*, 2007). Inibe o desenvolvimento da aterosclerose em coelhos alimentados com gordura (CHEN *et al.*, 2003), sendo eficiente contra oxidação de LDL e hiperlipidemia (CHEN *et al.*, 2004; SUBOH *et al.*, 2004).

Hibiscus cannabinus Linn é conhecido como Kenaf. Na sua composição química foram encontrados taninos, polifenóis, alcaloides, óleos essenciais e esteróides (YONG *et al.*, 2007; MOUJIR *et al.*, 2007). É muito utilizado na medicina popular para tratamento de machucados, náusea, febre e puerpério (LAWTON, 2004). A casca e o caule são utilizados no tratamento da fadiga e anemia (AGBOR *et al.*, 2005b). As folhas são empregadas no tratamento da disenteria e desordem do sangue e garganta (LAWTON, 2004).

MOUJIR *et al.* (2007) mostraram que a casca de *Hibiscus cannabinus* contém as seguintes substâncias: lignas, lignanamidas, derivados de tiramida, aldeídos fenólicos, álcools de cadeia longa, alcanos, esteróides e triterpenos com atividade antimicrobiana e citotóxica. Dentre estes, dois compostos tiveram forte atividade contra três linhagens de células tumorais em vários estágios de divisão celular.

Hibiscus esculentus Linn é conhecido popularmente por Okra. Sua semente é rica em ácido graxo insaturado, tal como, o ácido linoléico (OYELADE *et al.*, 2003). É considerado um estimulante estomacal e antipasmódico (ANON,

2003b). O extrato da planta tem atividade anti-ulcerogênica e é utilizado para desordens gástricas (GÜRBÜZ *et al.*, 2003).

O extrato aquoso de *Hibiscus macranthus* Linn possui alcalóides, flavonóides, glicídios e traços de quinonas. Quando combinado com outras plantas como *Aloe buettneri* A. Berger (*Liliaceae*), *Dicliptera verticillata* Forssk (*Acanthaceae*) e *Justicia insularis* T. Anderson (*Acanthaceae*). Tem efeito estrogênico que estimulam o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) induzindo a síntese de estrogênio (TELEFO *et al.*, 2004). Aumenta também os níveis de testosterona, corrigindo a impotência em ratos adultos (MOUNDIPA *et al.*, 2006).

Hibiscus tiliaceus Linn é uma árvore conhecida popularmente como algodão-da-praia. No extrato metanólico das flores secas, foram identificados compostos como ácidos graxos, α -tocoferol, fitosterol, vitamina E, estigmasterol, taninos, flavonóides, quinonas (BELL, 2006). É utilizado na medicina popular para tratar febre, acalmar a tosse, disenteria e infecções do ouvido (Ali *et al.*, 1980). A infusão da madeira é utilizada para expelir a placenta e combater as desordens pós-parto (BELL, 2006) e doenças da pele (SING *et al.*, 1984; HOLDSWORTH *et al.*, 1992).

1.1.1 *Hibiscus pernambucensis* Arruda

H.pernambucensis Arruda é conhecido popularmente pelo nome de Guaxima-do-Mangue (ROCHA *et al.*, 2002). Tem sua origem no Brasil (LIRA *et al.*, 2004) e é amplamente distribuído nas áreas costeiras tropicais (FRYXELL, 2001). Esta planta é encontrada em áreas de manguezais, restingas e na transição entre mangue e restinga (COGNI, 2003).

É um arbusto de aproximadamente 1,5 a 3,0 metros de comprimento (ROCHA & NEVES, 2000; ARZALUZ *et al.*, 2001). Sua descrição morfológica consiste de folhas simples (figura 1), alternadas, com um par de estípulas caducas. Os pecíolos são pilosos com 10 a 14 cm de comprimento. A lâmina foliar é cordiforme (figura 1), medindo de 10 a 15 cm de comprimento por 13 a 18 cm de largura, com textura coriácea, discolor, denso tomentosa pela face abaxial, com tricomas estrelados, ápice acuminado, margem levemente

crenada. As flores são totalmente amarelas (figura 2), que na senescência murçam e adquirem uma coloração avermelhado antes de se desprenderem dos pedúnculos. A floração e frutificação atingem seu pico a partir de meados de dezembro até o mês de março. Nos outros meses do ano, há floração ocasional (ROCHA & NEVES, 2000).

A composição química das flores secas, em extrato metanólico, compreende fitosteróis, tais como, estigmasterol. Há também a presença de taninos, flavonóides, antocianidinas, quinonas, α -tocoferol e vitamina E (DENG *et al.*,2003).



Figura 1. Partes aéreas de *H. pernambucensis* Arruda.



Figura 2. Flor de *H. pernambucensis* Arruda.

Conforme COE (2008), o cozimento da casca e folhas do *H. pernambucensis* Arruda é utilizado, em medicina popular, para interromper hemorragia menstrual excessiva, reduzir a febre e aliviar a constipação.

1.1.2 Diferenças entre *H. tiliaceus* Linn e *H. pernambucensis* Arruda

Anteriormente, pensava-se que o *H. pernambucensis* era uma subespécie ou variedade de *H. tiliaceus*, pois apresentavam características morfológicas semelhantes (FRANCIS, 2009). Entretanto FRYXELL (2001) e KRAPOVICKAS (2009) confirmam que se trata de duas espécies diferentes e independentes. As flores e o estigma de *H. pernambucensis* são completamente amarelos (figura 3), sem nenhuma mancha basal e a corola é enrolada e cerrada. Enquanto que *H. tiliaceus* tem as flores amarelas com uma mácula púrpura na base das pétalas (figura 4), estigmas purpúreos e corola completamente aberta sob a forma arredondada (figura 4 e 5) (ROCHA & NEVES, 2000).



Figura 3. *Hibiscus pernambucensis* Arruda.



Figura 4. *Hibiscus tiliaceus* Linn.

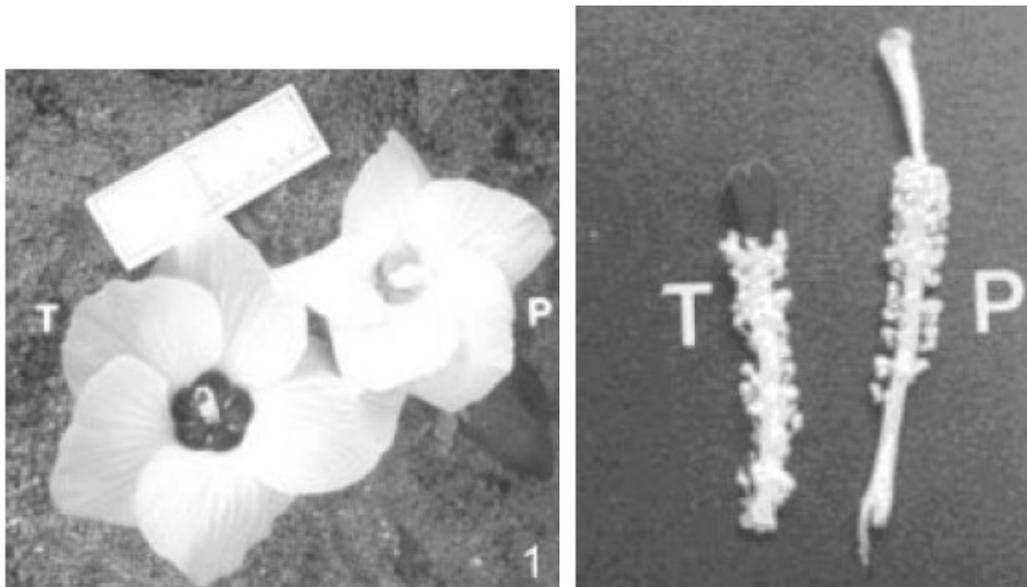


Figura 5. Comparação das flores e estigma de *H. tiliaceus* Linn (T) e de *H. pernambucensis* Arruda (P) (ROCHA & NEVES, 2000).

ROCHA & NEVES (2000) mostraram as características morfoanatômicas mais relevantes para distinguir as duas espécies (figura 5). Estes autores descreveram que *H. tiliaceus* possui folhas de textura cartácea, flores amarelas com mácula púrpura na base das pétalas e estigmas purpúreos. A floração e frutificação acontecem durante o ano inteiro. Há estômatos nas duas faces, presença de estrias epicuticulares e idioblastos mucilaginosos na face adaxial, epiderme abaxial com células de paredes mais sinuosas e menor densidade de tricomas estrelados. A hipoderme está presente ao lado da folha com interrupções no mesofilo, canais secretores distribuídos regularmente e em maior número no pecíolo, nervura principal e também maior quantidade de drusas. No *H. pernambucensis*, foram observadas folhas de textura coriácea, flores e estigma totalmente amarelas. A floração e frutificação atingem seu pico nos meses de dezembro a março. Os estômatos se localizam somente na face abaxial. Há ausência de estrias epicuticulares e idioblastos mucilaginosos. A epiderme abaxial com células de parede menos sinuosas e maior densidade de tricomas estrelados, hipoderme ausente na nervura mediana e sem interrupções no mesofilo. Os canais secretores são distribuídos irregularmente, em menor número no pecíolo, nervura principal e menor quantidade de drusas.

ROCHA & NEVES (2000) mostram que as características morfoanatômicas supracitadas separam essas duas espécies, ou seja, *H. tiliaceus* e *H. pernambucensis* têm características diferentes e são espécies distintas.

MAGALHÃES et al.(2004) contribuíram para circunscrição taxonômica destas duas espécies. Isto foi realizado com base nas suas diferenças morfológicas polínicas que foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Em estudos mais recentes, *TAKAYAMA et al.* (2006 e 2008) analisaram marcadores de microssatélites e DNA cloroplástico (cpDNA) de 766 indivíduos de *Hibiscus*. Neste trabalho, foi realizada comparação entre *H. tiliaceus* e suas espécies relacionadas (figura 6) por PCR-SSCP (reação em cadeia da polimerase com um único eixo de polimorfismo conformacional) e PCR-SSP (PCR com seqüência específica de primers).

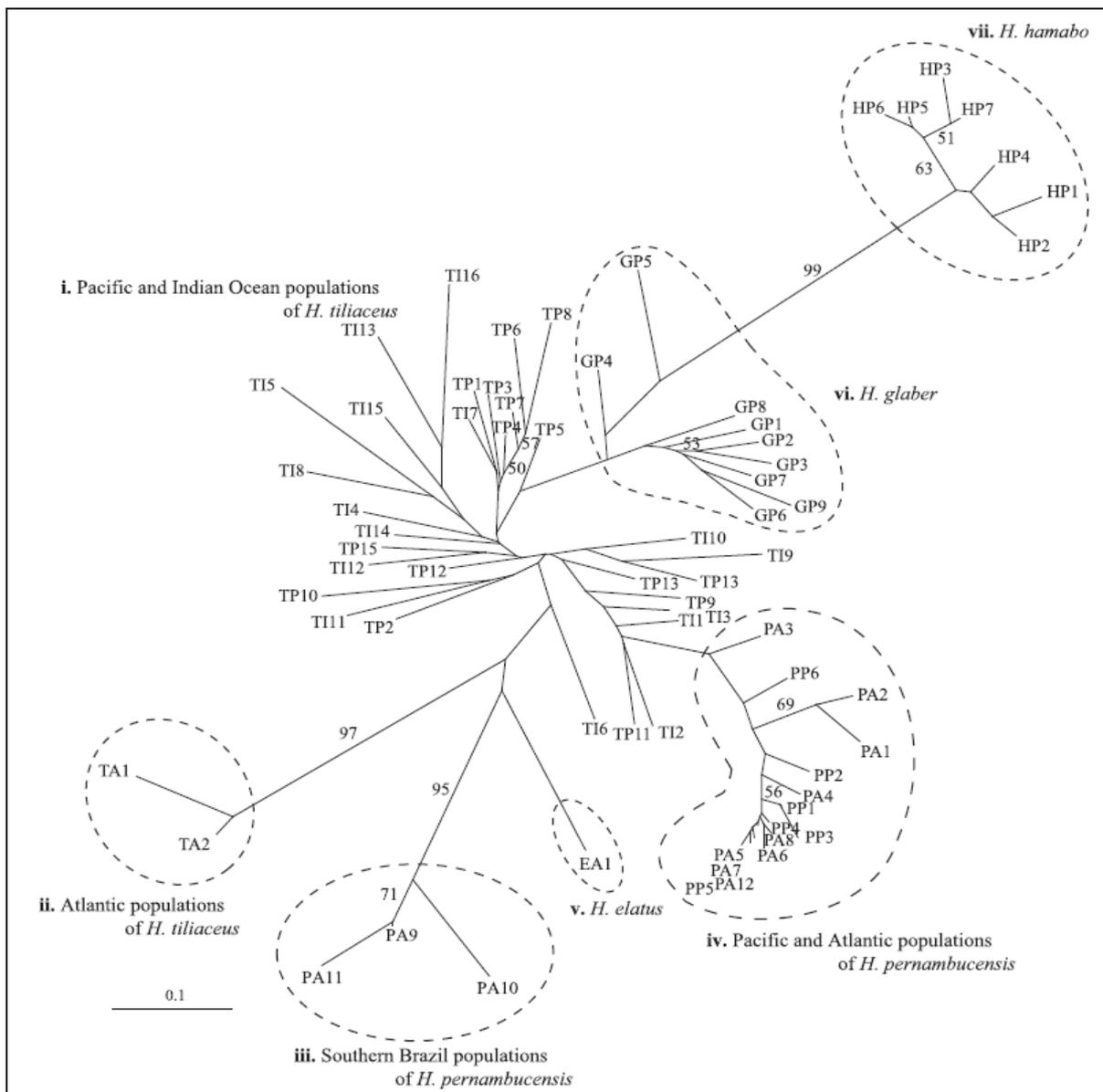


Figura 6. Diferenciação genética de *Hibiscus tiliaceus* e suas espécies aliadas (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

Este estudo de análise filogenética (figura 6) mostrou que *H. tiliaceus* e *H. pernambucensis* são bem diferentes e se originaram – independentemente – fora da área de distribuição de *H. tiliaceus* por hibridização e introgressão.

Devido à longa distância de dispersão das sementes pelo mar e/ou adaptação a um novo habitat, houve redução do fluxo de genes. Isto ocorreu

após 3,1-3,5 milhões de anos atrás com o encerramento do Istmo do Panamá (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

Em função das várias diferenças morfológicas e moleculares, essas duas espécies devem ser consideradas diferentes. Isto foi corroborado por KRAPOVICKAS e KAJITA (2009).

Tendo em vista esta classificação mais recente, é importante ressaltar que os trabalhos publicados por MELECCHI (2005, 2006), ROSA *et al.* (2006, 2007), MAGANHA (2009), que se referem à espécie *H. tiliaceus*, na verdade devem ser considerados como sendo da espécie *H. pernambucensis*.

MELECCHI (2005) e colaboradores (2006) analisaram micronutrientes nas cinzas totais do extrato das flores de *H. tiliaceus* e encontraram as seguintes substâncias majoritárias: ferro 227mg/kg (limite estabelecido na literatura 20-1000mg/kg) e cobre 16mg/kg (limite estabelecido na literatura 20mg/kg). No extrato metanólico das flores de *H. tiliaceus* verificou vitamina E, fitosterol e α -tocoferol. Alguns fitosteróis exibem prevenção contra o câncer e atividade imuno-moduladora.

ROSA *et al.* (2006) verificaram a composição química, propriedades antioxidantes e efeitos mutagênicos e antimutagênicos *in vivo* do extrato metanólico das flores de *H. tiliaceus*. Foi visto a presença de vitamina E e alguns derivados de estigmasterol. O tratamento com o extrato protegeu as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* contra H_2O_2 e tert-butil-hidroperóxido (t-BHP), mostrando uma clara atividade antioxidante. Também não foi mutagênico com *Salmonella typhimurium* e *S. cerevisiae* revelando uma significativa ação antimutagênica. Em 2007, avaliaram a genotoxicidade e propriedades antígenotóxica e antimutagênica do extrato metanólico das flores de *H. tiliaceus* contra danos oxidativo de H_2O_2 e t-BHP em células V79. Em concentrações que variam de 0,001-0,1mg/ml do extrato não foi citotóxico, genotóxicos ou mutagênicos. Não foram observados efeitos nocivos ou inibitórios sobre o crescimento de células V79. Sendo assim, verificou-se atividade antioxidante, antígenotóxica, antimutagênica e contra danos oxidativos em DNA.

MAGANHA (2009) avaliou os efeitos antioxidante *in vivo* e *in vitro*, mutagênico/antimutagênico e a determinação do teor de flavonóides, taninos e

polifenóis totais do extrato etanólico das flores de *Hibiscus tiliaceus*. O mesmo autor constatou atividade antioxidante que protegeu as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* contra danos oxidativos induzidos por H₂O₂. Isto também foi confirmado, *in vitro*, nos testes de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e xantina-oxidase. Observou-se que o extrato não é mutagênico e reduz, significativamente, a mutagênese induzida por H₂O₂, demonstrando assim um potencial de atividade antimutagênica.

1.2 Campo Eletromagnético

No ano de 1860, o físico escocês James Maxwell previu a possibilidade da existência das ondas eletromagnéticas. Este pesquisador descobriu que as leis experimentais da eletricidade e do magnetismo podiam ser resumidas numa forma matemática compacta – as equações de Maxwell. Em 1887, Henrich Hertz produziu as ondas eletromagnéticas pela primeira vez em laboratório. Desde as descobertas desses cientistas, houve um aumento à exposição das freqüências de rádio de campo eletromagnético nos últimos 20 anos devido à introdução de novas tecnologias, especialmente as comunicações móveis (NEUBAUER *et al.*, 2007). Dentre estas, a telefonia celular é a que mais cresce no Brasil.

Os telefones celulares e os sem fio usam a radiação não-ionizante para emitir e receber mensagens. Esse tipo de radiação possui energia menor que 10 eV e comprimento de onda maior que 200nm, não possuindo energia capaz de produzir emissão de elétrons (EBLEM, 2006; JUNIOR & MARTIN, 2006). A telefonia móvel popular utiliza o intervalo de freqüência de 800 a 2.200MHz (figura 7). Essa faixa de freqüência é classificada como ultra-alta freqüência, que vai de 300MHz a 3GHz, e vem crescendo com o desenvolvimento dos sistemas de telecomunicações (VERSACHAVE & MAES, 1998; PAVICIC & TROSIC, 2008).

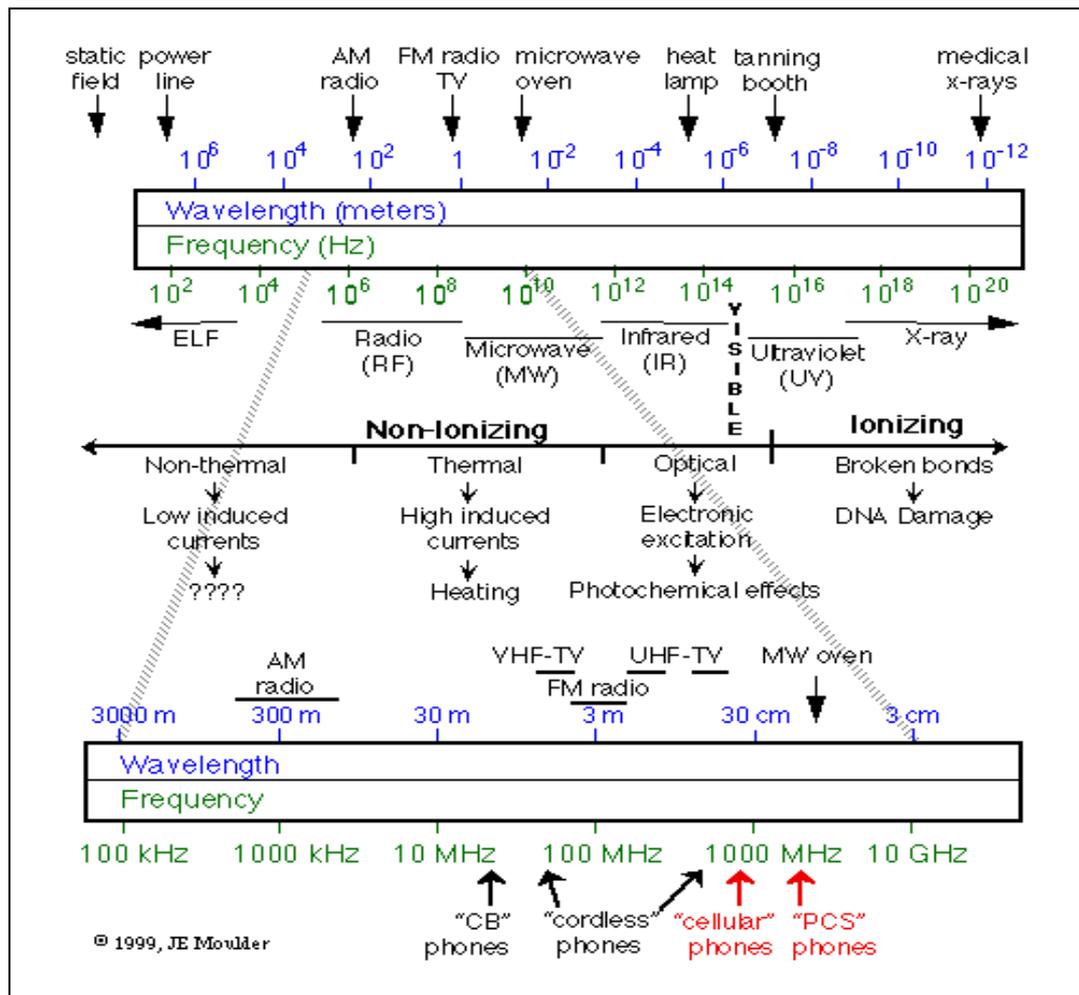


Figura 7. Espectro eletromagnético.

As radiações não-ionizantes são capazes também de produzir calor. Para limitar os efeitos térmicos sobre o organismo, usa-se a SAR (taxa de absorção específica) (SALLES *et al.*, 2003). Esta é uma grandeza física para quantificar os limites básicos de exposição às ondas eletromagnéticas. Essa medida representa a taxa de potência absorvida por unidade de massa e é dada em Watt por quilograma. Até o nível de SAR igual a 4 W/Kg não há dano por efeito térmico tendo em vista a temperatura do tecido não ultrapassar 1°C. Além dessa SAR, pode haver um comprometimento da capacidade termoregulatória do corpo, resultando em níveis danosos (BENHARDT, 1992; ICNIRP, 2009). A SAR permitida pelas normas internacionais (ICNIRP, 2009) para os Campos eletromagnéticos (CEM) na faixa da radiofrequência é menor

que 2 mW/g. Este valor considera somente os efeitos térmicos, representando metade do valor para provocar elevação de temperatura.

As ondas eletromagnéticas de ultra-alta-freqüência constituem um risco para a saúde humana (VAN WIJNGAARDEN *et al.*,2000). O maior uso dos telefones móveis e o aumento das estações de radio base (JADIDID *et al.*, 2007) têm atraído atenção quanto aos possíveis efeitos sobre a saúde. Há possibilidade que o CEMUAF possa interagir com diferentes vias de apoptose em células cerebrais (PANAGOPOULOS *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2007). Além disso, o CEMUAF pode ter efeitos sobre o ciclo celular, a atividade enzimática, a expressão de genes e danos cromossomais (BISHT *et al.*, 2002; ZENI *et al.*, 2003). CEMUAF também podem estar relacionados com leucemias (TYNES & HALDORSEN, 2003), linfomas (VILLENEUVE *et al.*,2000) e doenças de Alzheimer (QIU *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos de populações que vivem próximas às antenas de Estação Rádio-Base (ERB) revelam que as pessoas têm alterações no sono, dores de cabeça, dificuldades de atenção e fadiga (ROOSLI , 2003; NAVARRO *et al.*, 2008).

Alguns artigos têm relacionado o CEMUAF com a produção de Espécies Reativas de Oxigênio em sistemas biológicos (ERO) (MOUSTAFA *et al.*, 2001; ZMYSLONY *et al.*,2004; SIMKO *et al.*, 2006; YUREKLI *et al.*, 2006; ARTHUR, 2007; VALKO *et al.*,2007; PHILLIPS *et al.*, 2009). As ERO são constituídas por radicais livres de oxigênio e por moléculas potenciais formadoras de radicais livres de oxigênio (DRÖGE, 2002).

1.3 Radicais Livres em Sistemas Biológicos

A oxidação biológica é um processo primitivo que requer conseqüências inevitáveis de toxicidade de O₂ (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005). Os efeitos dos danos em organismos aeróbicos variam consideravelmente com os tipos de organismos e a toxicidade do oxigênio é influenciada pela presença, na dieta, de variadas quantidades de vitaminas (HALLIWELL, 2009). De acordo com CURTIN *et al.* (2002), várias doenças

estão ligadas aos radicais livres, tais como aterosclerose, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington.

O estresse oxidativo pode ocorrer devido a aumento de produção das espécies reativas de oxigênio e/ou uma redução das defesas antioxidantes (Figura 8). Muitos componentes da via do estresse oxidativo também atuam como elementos de sinalização celular (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

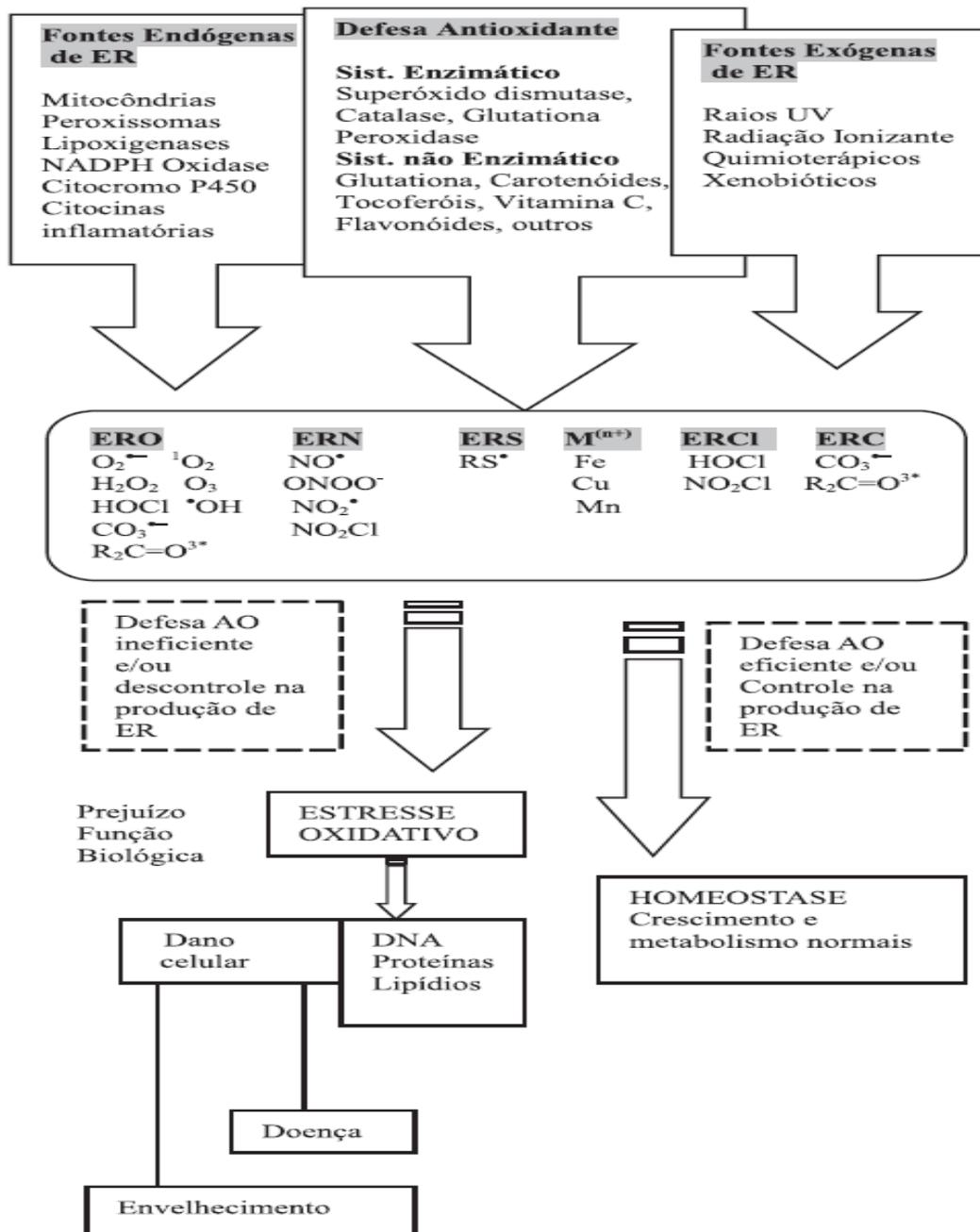


Figura 8. Fontes e respostas celulares às espécies reativas (ER) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

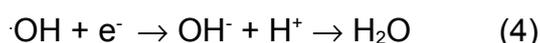
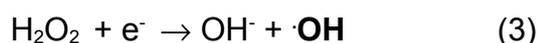
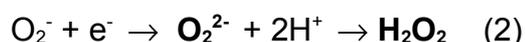
1.3.1 Bioquímica das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Durante a produção oxidativa de energia na mitocôndria, o oxigênio é reduzido por 4 elétrons pela citocromo-oxidase, formando 2 moléculas de água (COHEN, 1989). Contudo, em mamíferos, há um vazamento de elétrons da

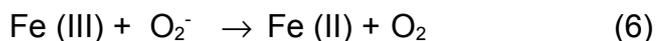
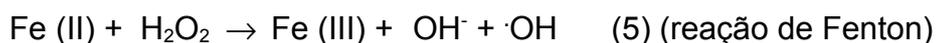
cadeia respiratória (de 1 a 4%) onde o oxigênio é reduzido por um elétron, produzindo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A geração destes pela mitocôndria dependerá da tensão de O_2 e da sua concentração no tecido (ADDABBLO *et al.*, 2009).

Uma espécie química capaz de existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados, é definida como radical livre. Um elétron desemparelhado ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular (CADENAS, 1995; AUGUSTO, 2006; HALLIWELL, 2007).

A rotação de cargas elétricas gera um campo magnético. O emparelhamento de elétrons de spins opostos neutraliza este efeito, mas o elétron desemparelhado torna a espécie paramagnética (ligeiramente atraída pelo campo magnético), podendo fazer também com que esta se torne altamente reativa. O O_2 é paramagnético, contendo dois elétrons desemparelhados e com o mesmo spin (FRIDOVICH, 1998; AUGUSTO, 2006; HALLIWELL, 2007). Assim, o O_2 tende a ocupar estes spins através de reações de redução monoelétrica, levando à formação das espécies $O_2^{\cdot-}$ e O_2^{2-} (superóxido e peróxido, respectivamente – reações 1 e 2).



A redução monoelétrica do H_2O_2 se dá por uma fissão heterolítica da ligação O-O, levando à formação do radical hidroxil ($\cdot OH$) e do ânion hidroxila (OH^-) (reação 3). Quando o radical hidroxil é reduzido, ele forma o ânion hidróxido que poderá reagir com um próton formando a água (reação 4). *In vivo*, os agentes doadores de elétrons para o H_2O_2 normalmente são metais de transição como ferro e cobre, através da reação de Fenton (reação 5). Os íons de Fe (II), utilizados na reação, podem ser reciclados pela reação de Fe (III) com agentes redutores como o $O_2^{\cdot-}$ (reação 6). O somatório das reações 5 e 6 resulta na reação de Haber-Weiss (reação 7) (MCCORD & DAY, 1978; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).



O radical superóxido é gerado em todos os compartimentos celulares, podendo ser produzido por autooxidação de pequenas moléculas, como flavinas, catecolaminas (MACARTHUR *et al.*, 2000), hidroquinonas, ativação de macrófagos e neutrófilos (na ação da NADPH oxidase), atividades de várias oxidases, como a xantina oxidase, citocromo P450 e cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e cloroplástica, através de proteínas Fe-S e da coenzima Q (CADENAS, 1995; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

O radical superóxido, em pH neutro, possui uma meia-vida de segundos. Ele tem baixa reatividade e não é capaz de atravessar membranas, mas é potencialmente danoso, justamente por poder se difundir a distâncias consideráveis, até encontrar um alvo (AUGUSTO, 2006). Esse radical pode provocar grandes danos oxidativos nas estruturas subcelulares, através da formação do radical hidroxil, via reação de Haber-Weiss (CUZZOCREA *et al.*, 2001). Algumas enzimas, como a aconitase, podem ser inativadas diretamente por O_2^- , sendo que a baixa atividade desta enzima é considerado um indicador de estresse oxidativo *in vivo* (ANDERSON *et al.*, 1998; FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL, 2007).

O peróxido de hidrogênio é produzido principalmente pela dismutação do superóxido, mas existem enzimas que o produzem sem o intermédio de O_2^- (por exemplo, a glicolato oxidase, D-aminoácido oxidase, urato oxidase) (AUGUSTO, 2006). Apesar do H_2O_2 ser um fraco agente oxidante, ele é capaz de inativar algumas enzimas diretamente, geralmente por oxidação de grupos tióis (como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (HALLIWELL, 2009). SOHAL *et al.* (1996) encontraram que quanto maior a concentração de superóxido e peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias, menor o tempo de vida de alguns animais.

A toxicidade do superóxido e do peróxido de hidrogênio é dependente da presença de ferro ou cobre, o que leva à formação do radical hidroxil, via

reação de Haber-Weiss (reação 7) e Fenton (reação 5), respectivamente. A natureza e o local de danos do hidroxil irão depender da presença de metais de transição. O radical hidroxil é uma das espécies químicas de maior reatividade conhecida, podendo reagir com todo tipo de moléculas celulares (açúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, principalmente nos ácidos graxos poliinsaturados) com elevada velocidade (HALLIWELL, 2007). A constante de velocidade do radical hidroxil com biomoléculas está na faixa de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ISCHIROPOULOS, 1992). Devido à sua alta reatividade, o radical hidroxil é uma espécie de pequena difusão dentro da célula, provocando danos próximos dos sítios onde é gerado (CUZZOCREA *et al.*, 2001).

O sistema nervo central consome, em torno de 20% do oxigênio consumido pelo organismo, $160 \mu\text{mol}$ por 100g do peso cerebral por minuto (MAGISTRETTI *et al.*, 1999). Devido ao constante uso do oxigênio nas mitocôndrias, para suprimento de energia, os radicais livres são gerados, tornando o cérebro particularmente suscetível ao estresse oxidativo (GILGUNSHERKI *et al.*, 2002). Portanto, a capacidade das células em diminuir os efeitos do estresse oxidativo é determinada pelo balanço entre quantidades de espécies oxidativas geradas e a capacidade dos processos metabólicos de sintetizar antioxidantes (TRACHOOTAHAM *et al.*, 2008).

Os radicais livres ao reagirem com as biomoléculas – como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos – podem alterar a sua função original ou mesmo danificá-las (figura 9) (BARBOSA *et al.*, 2006).

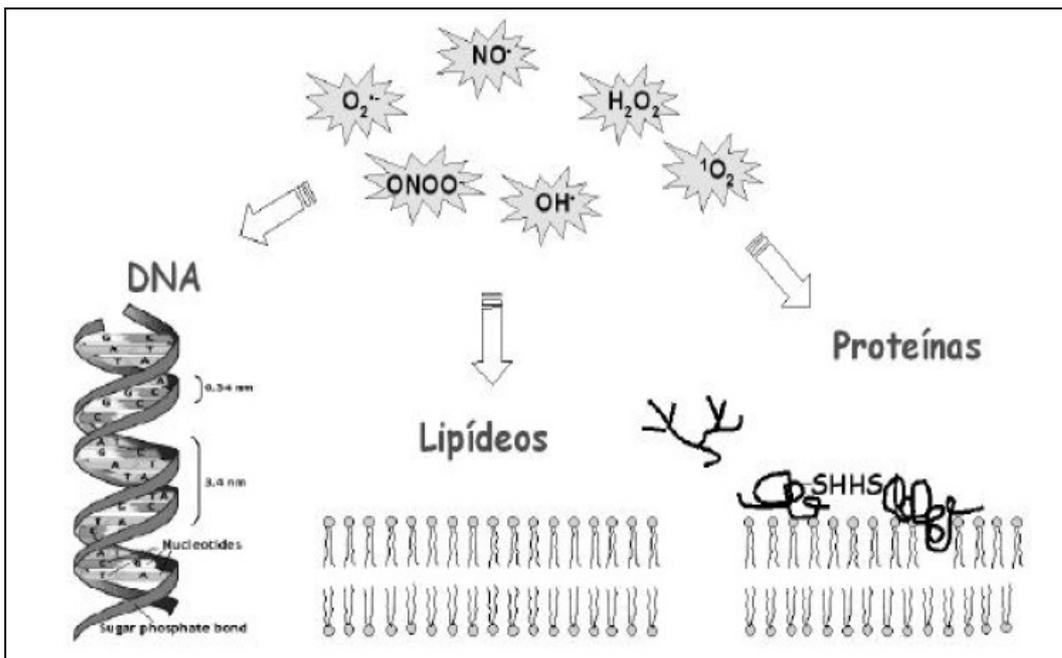


Figura 9. Dano oxidativo a macromoléculas biológicas (TORRES, 2003).

Legenda: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet (1O_2), radical hidroxil (OH^{\bullet}), ânion oxido nítrico (NO^{\bullet}) e ânion peroxinitrito (ONOO).

1.3.2 Danos Oxidativos às Proteínas

A introdução de grupos carbonila em proteínas é uma marca característica de modificação oxidativa e tem sido associada a danos oxidativos, via reação do radical hidroxil com as porções aminoterminal de peptídeos (STADMAN, 1992). A oxidação - mediada por ERO - de alguns resíduos de aminoácidos como a lisina, arginina e prolina leva à formação de grupos carbonila (STADMAN *et al.*, 1992; STADTMAN & LEVINE, 2000). Estes grupos também podem ser formados como consequência de reações secundárias de cadeias laterais de alguns aminoácidos com produtos de oxidações lipídicas ou, ainda, açúcares reduzidos ou seus produtos de oxidação (KRISTAL & YU, 1992). Proteínas podem sofrer outras modificações nos aminoácidos como, por exemplo, a oxidação dos grupos sulfidrilas, levando a modificações conformacionais, alteração de atividade enzimática, clivagem de ligações peptídicas, modificação de carboidratos em glicoproteínas e perda

de metais em metaloproteínas (STADMAN, 1992; DEAN *et al.*, 1997; LIMA & ABDALLA, 2001). As proteínas são oxidadas e degradadas por proteases citosólicas (STADMAN, 1992). Proteínas que contêm aminoácidos oxidados são reconhecidas e degradadas também por sistemas proteolíticos, dependentes de ubiquitina (JÚNIOR *et al.*, 2005). Os complexos protéicos que degradam essas proteínas oxidadas são chamados de proteassomas e estão presentes em muitas cópias no citosol (HERSHKO & CIECHANOVER, 1992).

A oxidação de proteínas está associada a situações de estresse oxidativo, como isquemia-reperfusão, hiperóxia, tabagismo, administração de estrógeno, ventilação artificial, exercícios forçados e em células de cultura expostas ao H₂O₂ ou xantina-oxidase. Os níveis elevados dos grupos carbonila estão associados a várias doenças tais como doença de Alzheimer (CALABRESE *et al.*, 2003), isquemia cerebral, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica familiar, transtorno degenerativo dos neurônios motores (AMES *et al.*, 1993; MOOSMANN & BEHL, 2002), doença de Huntington e esquizofrenia (RAO & BLACHANDRAN, 2002). Podemos incluir ataxia de Friedreich, citopatologias mitocondriais e outras doenças neuromusculares (BAKER & TARNOPLSKI, 2003). Também se incluem diabetes, artrite reumatóide, distrofia muscular e indução de tumores renais (HERMES-LIMA, 2004).

1.3.3 Peroxidação Lipídica

A ação das ERO sobre as membranas biológicas promove reações em cadeia que podem ocasionar a peroxidação de fosfolipídeos de membrana que contêm cadeias de ácidos graxos insaturados, gerando radicais peroxil, alcóxil e hidroperóxidos lipídicos (LIMA *et al.*, 2001) (figura 10).

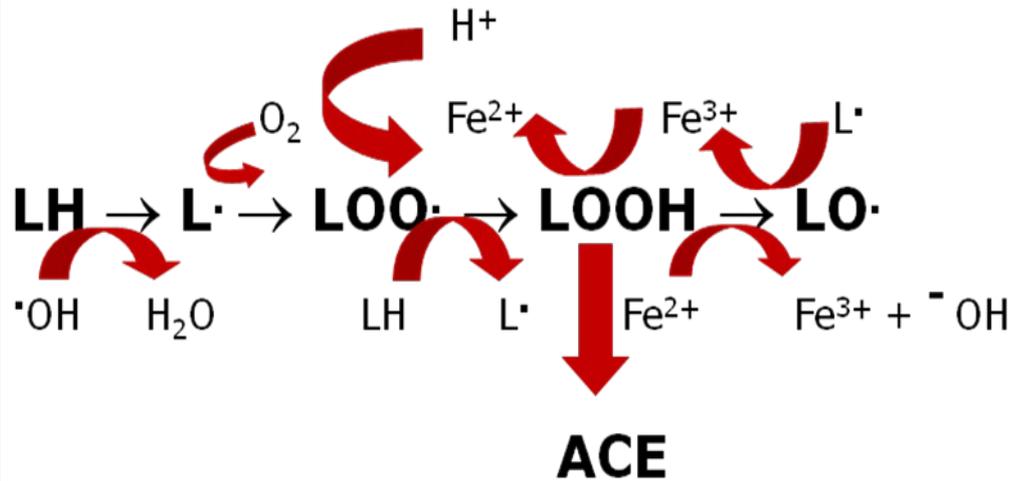


Figura 10. Propagação da peroxidação lipídica (modificado de Vaca *et al.*, 1988). Legenda: radical hidroxil (OH^\cdot), ácido graxo poliinsaturado (LH), água (H_2O), radical alquil (L^\cdot), oxigênio (O_2), radical lipoperoxil (LOO^\cdot), hidrogênio (H^+), ferro férrico (Fe^{3+}), ferro ferroso (Fe^{2+}), hidroperóxidos orgânicos (LOOH), ânion hidroxila (OH^-) e radical peroxil (LO^\cdot).

A peroxidação de lipídios de membranas altera a sua permeabilidade, fluidez, o fluxo iônico e pode levar ao seu rompimento. No caso de rompimento de membranas de organelas, pode ocorrer a liberação de proteases, de lípases e de íons, como, por exemplo, o cálcio que pode ativar desordenadamente uma série de enzimas dependentes de Ca^{2+} e diversas vias de transdução de sinal. Os hidroperóxidos podem ser quebrados em moléculas de baixo peso molecular (como alcanos, cetonas e aldeídos), que também são tóxicos para a célula (MARBAN *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1995; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; HERMES-LIMA, 2004). A peroxidação de membranas da mitocôndria hepática mediada por íons ferro é um evento importante na fisiopatologia da hemocromatose (HERMES-LIMA *et al.*, 1995a; SANTOS, 1998). A peroxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um fenômeno importante no processo de aterogênese (DARLEY-USMAR *et al.*, 1995).

A peroxidação lipídica se inicia pelo ataque à bicamada lipídica por qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio

de um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) (LIMA *et al.*, 2001). A retirada desse hidrogênio deixa um elétron não-pareado no átomo de carbono, que reage com o oxigênio molecular, formando o radical peroxil (LOO·) (figura 10) (LIMA *et al.*, 2001). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação. O radical peroxil se combina com o átomo de hidrogênio retirado, formando o hidroperóxido lipídico (LOOH) (HERMES-LIMA, 2004). Este hidroperóxido é instável na presença de metais de transição, como, por exemplo, o ferro e o cobre, formando os radicais alcoxil e peroxil (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). O radical alcoxil pode retirar átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos poliinsaturados e hidroperóxidos lipídicos, formando radicais lipídicos e peroxil, contribuindo assim para a propagação da peroxidação lipídica. A decomposição de LOOH não só gera radicais que propagam a peroxidação lipídica, mas também produtos não radicalares tais como aldeídos e cetonas entre outros. Esses produtos secundários são bem mais estáveis do que os radicais livres - que iniciaram o processo - e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação. Assim, o processo de peroxidação lipídica - após iniciado - torna-se autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundários (HERMES-LIMA, 2004).

1.3.4 Danos ao DNA

O DNA também é danificado por ERO, produtos da peroxidação lipídica e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que podem provocar quebra da fita e modificações oxidativas nas bases, gerando uma série de produtos (8-hidroxi guanina, 5-hidroximetil-glutaril e citosina-glicol) que podem levar a processos mutagênicos e carcinogênicos (COOKE & EVANS, 2005). O ataque de radicais também pode levar a reações cruzadas entre DNA e proteínas. Danos aos açúcares são vistos com frequência. Os danos múltiplos ao DNA (todas as lesões provocadas em regiões próximas ao DNA) juntamente com a quebra de cadeias duplas são genotóxicas e podem ser letais, mutagênicos e carcinogênicos (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

O dano oxidativo pode também contribuir para a diminuição de funções associadas com o envelhecimento normal, aumento da incidência de câncer associado à idade e também ser um fator importante na origem de outras doenças incluindo aterosclerose, derrames e doenças auto-imunes.

O superóxido e o peróxido de hidrogênio não atacam o DNA diretamente; já o radical hidroxil e o oxigênio singlete causam lesão direta (figura 11). O primeiro reage com as quatro bases nitrogenadas, formando bases modificadas e quebras nas cadeias do DNA e sítio apurínicos e apiridínicos (AP). O oxigênio singlete pode causar ciclo-adição aos carbonos de ligação dupla do anel imidazol, gerar sítios AP álcali-lábeis e quebra de cadeias ao lado de guaninas. O H_2O_2 causa oxidação de adenina. O radical oxil ($RO\cdot$) e o peroxil ($ROO\cdot$) oxidam açúcares. O alvo preferido das ERO é a guanina e o aduto mais comum é a 7,8 dihidroxi-8-oxo-2 desoxiguanina. O 8-oxoG é o produto de dano oxidativo, sendo altamente mutagênico tanto *in vitro* quanto *in vivo* com pequena ou nenhuma ação letal (figura 11) (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

A reparação do DNA pode ser por reversão *in situ*, reparo de emparelhamento incorreto das bases, reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

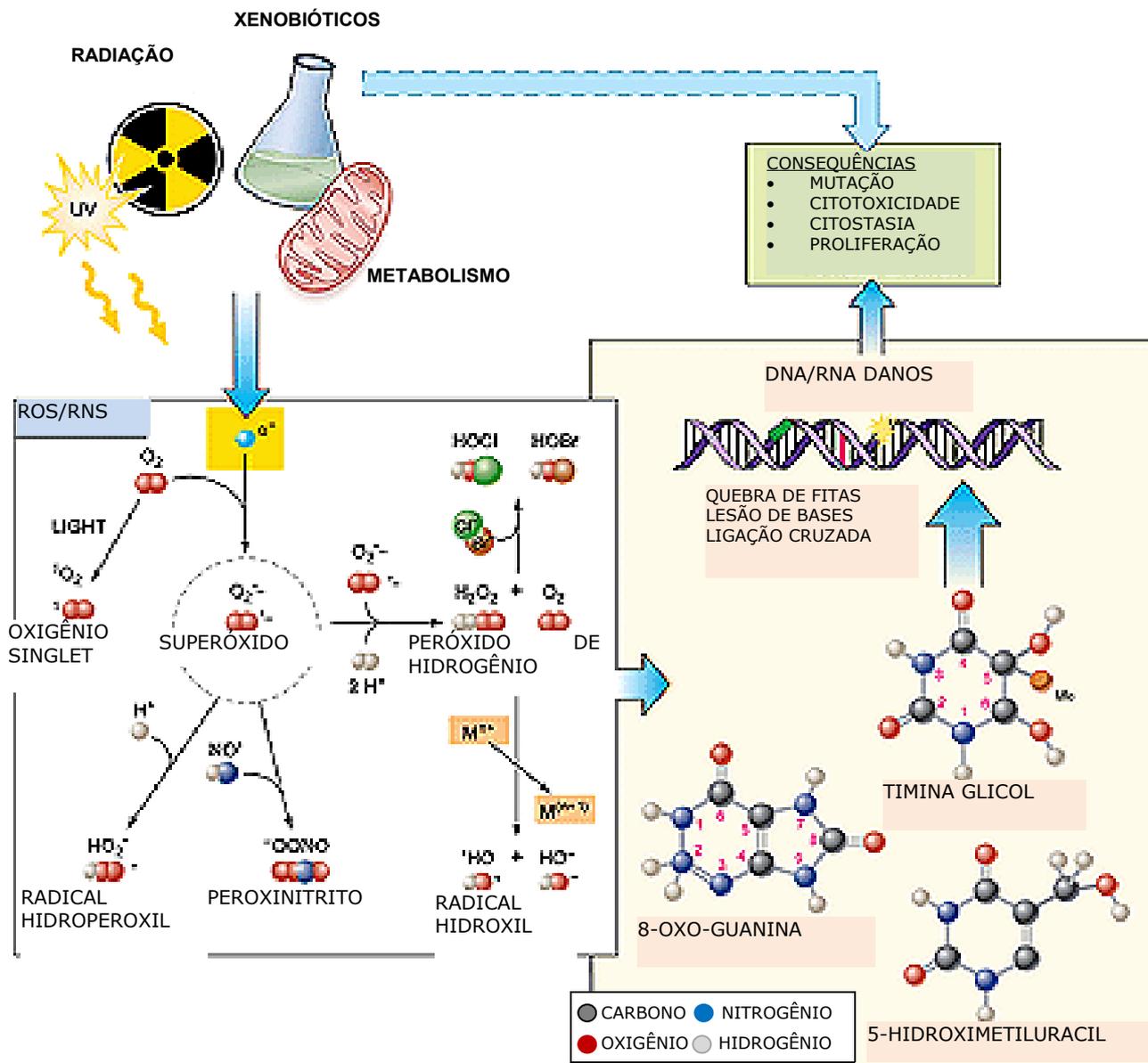


Figura 11. ERO e danos em DNA (COOKE & EVANS, 2005).

1.3.5 Antioxidantes

Qualquer substância que - quando presente em baixas concentrações, comparada com o oxidante, retarda ou inibe a velocidade de oxidação de um substrato - é considerada um antioxidante (HALLIWELL, 2008).

Ao longo do curso da evolução, organismos aeróbicos apresentaram defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (figura 7) relacionadas

com a adaptação às condições ambientais, sobrevivendo apenas os mais aptos que se defenderam dos danos provocados por ERO (ÇIMEN, 2008). Essas defesas incluem principalmente a superóxido dismutase (Sod), que catalisa a dismutação do radical superóxido, a catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio, e a glutatona peroxidase (GPx) que decompõe não só o peróxido de hidrogênio como também hidroperóxidos orgânicos, usando glutatona como substrato (HERMES-LIMA *et al.*, 1998, 2001; ÇIMEN, 2008) (figura 12).

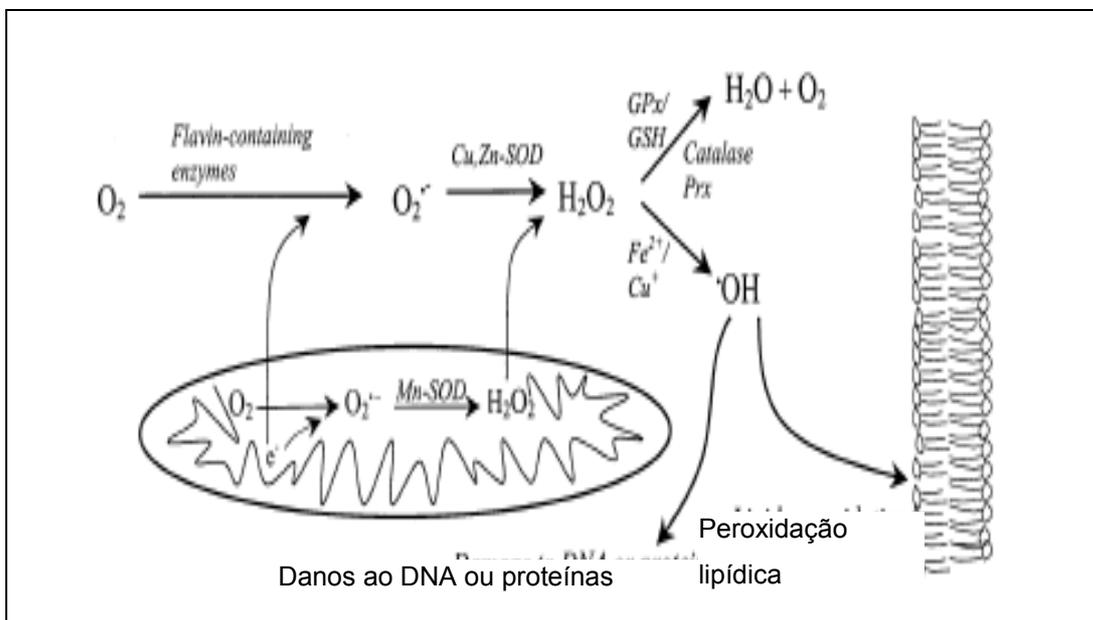


Figura 12. Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes (NORDBERG & ARNER, 2001). Legenda: oxigênio (O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido dismutase cobre e zinco (CuZnSod), glutatona peroxidase (GPx), glutatona (GSH), água (H_2O), ferro ferroso (Fe^{2+}), radical hidroxil (OH^{\cdot}), superóxido dismutase manganês (MnSod).

As defesas não-enzimáticas são formadas, na sua maioria, por moléculas de baixo peso molecular. Os antioxidantes endógenos não-enzimáticos são divididos em duas fases: lipofílicos (vitamina A, E, carotenóides, ubiquinona, melatonina, etc) e hidrossolúveis (vitamina C,

glutationa, ácido úrico, ceruloplasmina, transferina, haptoglobulina, etc.). A maioria dos antioxidantes não-enzimáticos é encontrada em meio aquoso (plasma, citoplasma, matriz mitocondrial, etc); a vitamina E e os carotenóides se encontram nas membranas (BIANCHI *et al.*, 1999; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação dessas defesas é a interrupção da cadeia de reações oxidativas, interrompendo a propagação das reações radicalares (DI MASCIO *et al.*, 1991; CADENAS, 1995; ÇIMEN, 2008).

As vitaminas antioxidantes A, C e E fornecem defesa contra dano oxidativo. A vitamina C e E trabalham juntas a inibir as reações de peroxidação lipídica nas lipoproteínas do plasma e membranas. A vitamina A (retinol), que é um potente capturador de radical livre, é um antioxidante lipofílico (ÇIMEN, 2008). Serve como um pro-hormônio por retinóides e está envolvido com a transdução de sinal e sítios de membrana citoplasmática (CZERNICHOW & HERSBERG, 2001).

Há também a defesa por meio da prevenção de formação das ERO. Nesse mecanismo, podem-se citar os quelantes de metais de transição. Estes não deixam o metal de transição livre para realizar a reação de Fenton. Exemplos de quelantes protéicos são a ceruloplasmina (quelante de cobre) e a transferrina (quelante de ferro) (AHMAD, 1995; ÇIMEN, 2008).

Alguns pesquisadores têm verificado que determinados metais, como o zinco e o magnésio, também exercem função antioxidante, estabilizando membranas e/ou proteínas e minimizando a susceptibilidade ao ataque de ERO (POWELL, 2000).

1.4 Polifenóis Totais

Os polifenóis são descritos na literatura como pertencentes a um grande grupo de compostos encontrados na natureza. Apresentam em suas características principais a presença de grupos fenólicos encontrados em frutos, sementes, folhas, flores e cascas (FALLER & FIALHO, 2008). Esses são produtos do metabolismo normal das plantas que tem a capacidade de protegê-las contra patógenos e predadores herbívoros (MONTEIRO *et al.*, 2005). Sabe-se muito a respeito da ação dos polifenóis à saúde humana por

apresentarem características antioxidantes, anti-carcinogênicas, anti-aterogênicas, antitrombóticas e vasodilatadoras.

O fenol é constituído de um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (-OH). Um polifenol é uma estrutura que apresenta mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel. Os polifenóis, conforme sua estrutura química pode ser dividida em pelo menos dez diferentes classes, uma delas são os flavonóides (FALLER & FIALHO, 2008).

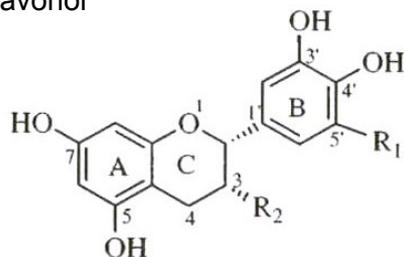
1.4.1 Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas e biossintetizados pela via dos fenilpropanóides (SIMÕES *et al.*, 2000). A quantidade de flavonóides em plantas depende da variação das espécies, do lugar onde são plantadas, dos períodos de seca e chuva, de fatores artificiais como poluente e grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioleta B (BURNS *et al.*, 2001; AHERNE & O'BRIEN, 2002; CATHERINE *et al.*, 2003; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Em geral, os flavonóides são encontrados nas folhas e podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos (SIMÕES, 2000). O mesmo composto pode apresentar diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra (SIMÕES, 2000).

Os pigmentos são compostos de baixo peso molecular e cuja estrutura está baseada no núcleo flavilium. Consiste de três anéis fenólicos ligados entre si por três carbonos (MARTINES-FLORES, 2002). O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel que na posição 2 carrega um anel fenil-benzeno como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando a estruturas básicas das leucoantocianinas (proantocianinas ou catequinas) e as antocianonas, denominado de núcleo flavan (AHERNE & O' BRIEN, 2002; BEHLING *et al.*, 2004). No terceiro anel ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavononas, isoflavonas, chalconas e auronas (figura 13) (AHERNE & O' BRIEN, 2002).

Flavonóides

Flavonol



Isoflavonas

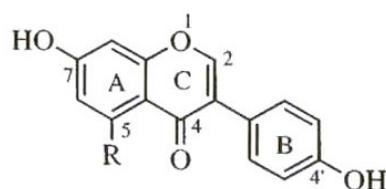
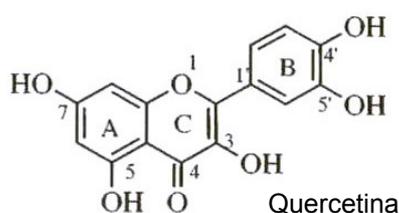


Figura 13. Representação esquemática dos flavanóis, flavonóis e isoflavonas, principais subclasses dos flavonóides (YANG *et al.*, 2001).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em flavonóides e os não-flavonóides. Os denominados de flavonóides são os que apresentam a estrutura química (C₆-C₃-C₆) (figura 14). Já os não-flavonóides são os derivados das estruturas químicas C₆-C₁ específicos dos ácidos benzóicos, gálicos e elágico; os ácidos cafêico e p-cumárico hidroxicinamatos apresentam C₆-C₃; e os trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeos apresentam C₆-C₂-C₆ (BURNS *et al.*, 2001; MELO & GUERRA,2002).

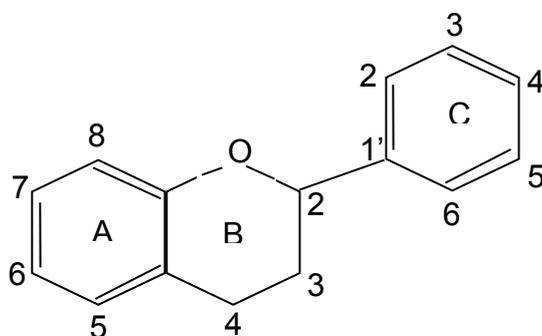


Figura 14. Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides são agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e inibir enzimas como a prostaglandina sintetase, lipoxigenase e a cicloxigenase (RAUHA *et al.*, 2000).Essas moléculas têm o potencial de agir no meio aquoso da célula e também na camada fosfolipídica da membrana plasmática, sequestrando os radicais livres e evitando a propagação das reações em cadeia que poderiam causar possíveis danos oxidativos (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Muitos destes compostos apresentam grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antiinflamatória, antiplaquetária e vasodilatadora (KOO & SUHAILA, 2001). Essas moléculas têm capacidade neuroprotetora por atravessar a barreira hematoencefálica *in vitro* e *in situ* (YOU DIM *et al.*, 2003), exercem proteção às células endoteliais da aorta, melhorando a viabilidade contra os danos oxidativos (LAW *et al.*, 1999), têm efeito direto sobre a sinalização celular (SCHROETER *et al.*, 2002). Sugere-se que a antocianina possua habilidade de estabilizar o DNA (MAS *et al.*, 1991), além de apresentar propriedades de quimioproteção em modelo animal de carcinogênese de mama, pele, pulmão e gastrointestinal (THOMASSET *et al.*, 2009).

Enfim, é importante a utilização da suplementação de antioxidantes não-enzimáticos à saúde para minimizar os danos oxidativos provocados por mecanismos endógenos ou exógenos ao organismo.

Em vista do que foi exposto, é provável que a administração da infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* proteja o cérebro e o fígado das ratas contra os danos oxidativos produzidos pelas ondas eletromagnéticas de ultra-alta-freqüência. Esta proteção é devido à composição química desta planta que apresenta vitamina E, quercetina, taninos e fitosteróis.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar a ação antioxidante da infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* Arruda diante da exposição crônica ao campo eletromagnético de ultra-alta frequência (1W, 950MHz e polarização vertical) sobre o fígado e o córtex cerebral de ratas expostas durante a gestação e a lactação.

2.2 Específicos

- ✓ Determinar os níveis de peroxidação lipídica pelo método de TBARS;
- ✓ Dosar os níveis de proteínas oxidadas pelo método de proteínas carboniladas;
- ✓ Determinar os níveis de danos em DNA pelo método cometa;
- ✓ Quantificar o conteúdo de polifenóis totais e flavonóides da infusão das flores de *H. pernambucensis* Arruda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados conforme o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (NIH publicação nº 85-23, revisada em 1996). Vinte e quatro ratas grávidas ***Rattus norvegicus Wistar*** de 3 meses de idade foram usadas neste trabalho. Foram analisados o córtex cerebral e o fígado das mães. Antes da exposição, as ratas grávidas e seus filhotes foram mantidos em caixas individuais (40,5 x 33,3 x 17,5 cm), sob um ciclo de 12h luz/12h escuro na temperatura de $23 \pm 0,5$ °C com água e dieta comercial equilibrada *ad libitum*. Durante a meia hora de exposição, os animais não beberam água e nem se alimentaram. Estas condições continuaram até os filhotes chegarem aos 21 dias. Esses eventos foram realizados na sala experimental do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

3.2 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa seguiu as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da ULBRA e foi protocolado no comitê dessa universidade com o número de 2006-025A.

3.3 Delineamento do Estudo

As ratas grávidas expostas foram colocadas em caixas, desde o primeiro dia de gravidez, com a companhia de outra rata grávida do mesmo grupo para se evitar o estresse do isolamento. Foi considerado o primeiro dia de gravidez aquele que teve a presença do espermatozóide no canal vaginal. Isto foi visto por meio de análise de microscopia óptica (ZEISS Axiophot, magn, x100). Um total de vinte e quatro ratas grávidas foram utilizadas, sendo seis ratas no grupo controle (RC), seis no grupo irradiado por CEMUAF (RE), seis ratas irradiadas por CEMUAF que tomaram a infusão das flores de *H.*

pernambucensis (REH) e seis ratas controles que tomaram a infusão das flores de *H. pernambucensis* (RCH). O grupo controle foi submetido às mesmas condições do grupo irradiado, mas sem a exposição das ondas eletromagnéticas. A infusão das flores de *H. pernambucensis* foi administrada por gavagem às ratas expostas e as controles, 30 minutos antes da exposição às ondas eletromagnéticas. As ratas grávidas foram irradiadas ½ hora por dia, desde o dia da detecção do espermatozóide até o nascimento dos filhotes. As caixas dos grupos irradiados foram dispostas à frente da antena, distando 11cm desta. A antena e as caixas ficaram sempre dentro de uma gaiola de "Faraday", feita de alumínio. O campo eletromagnético (CEM) fora das gaiolas foi de 0.30V/m. A gaiola com o grupo controle ficou distante 92cm da gaiola contendo o grupo irradiado. Cada uma das gaiolas foi colocada sobre um suporte ficando na mesma altura. O CEM dentro da gaiola das ratas controles foi de 0.15V/m e dentro da gaiola das ratas expostas foi de 35V/m. A taxa de absorção específica (SAR) do grupo exposto variou de 0,64 a 0,44W/kg no cérebro e de 0,99 a 0,67W/kg no fígado, estes valores foram calculados para ratas variando de 90 a 132 dias de idade. Foi usado um sistema gerador de ondas eletromagnéticas - formado pelo gerador "Aural STL Transmitter model PCL-303 (Moseley PCL-303)" e pela antena "Precision Half-Wave Dipole". O medidor "Radiation Meter EMR-30 (do fabricante Wandel & Goltermann) foi usado para medir a intensidade do CEM. O sistema foi ligado ½ hora/dia/caixa.

Após os 42 dias de exposição ao CEMUAF, as ratas foram sacrificadas por decapitação com guilhotina. O córtex cerebral e o fígado foram removidos imediatamente para o nitrogênio líquido e mantido em um ultra-freezer a – 80° C, para ser analisado posteriormente.

3.4 Coleta, processamento e armazenamento das flores de *H. pernambucensis*

As flores de *H. pernambucensis* foram coletadas nos mangues de Florianópolis (no estado de Santa Catarina) no mês de dezembro 2007. Esta planta foi catalogada e depositada no herbário no Instituto de Botânica da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com o número ICN 160426. As flores foram colhidas frescas, colocadas sobre papel de jornal para eliminar a umidade e evitar deterioração. Posteriormente, as flores foram secas em estufa a uma temperatura fixa de 40° C. O material seco foi triturado em um gral de porcelana e armazenado em papel alumínio.

3.5 Preparação e Administração da Infusão das flores de *H. pernambucensis*

A infusão foi preparada na concentração de 5% (5g do extrato de flores de *Hibiscus* em 100 mL de água destilada) (RODRIGUES *et.al.*, 2004). A água foi aquecida à temperatura de aproximadamente 88°C, sendo adicionado ao extrato das flores secas e tampado por 10 minutos. Após, o extrato foi filtrado com papel filtro e armazenado na geladeira ao abrigo da luz. Em toda a semana, foi feita uma nova infusão para evitar possíveis contaminações.

3.6 Administração

A infusão foi administrada, diariamente, 30 minutos antes da exposição ao CEMUAF, por gavagem, no volume de 1,5mL, às ratas grávidas, à temperatura de 20°C (PRENESTI *et.al.*, 2007). Esse procedimento se repetiu por 42 dias, sendo 21 dias de gestação e 21 dias de amamentação.

3.7 Medida do Conteúdo de Polifenóis Totais

Na análise de quantificação de Polifenóis Totais, foram utilizadas como parâmetro de comparação positivo as infusões das flores de *H. sabdariffa* e o *H. rosa-sinensis*. Essas flores foram coletadas em Porto Alegre no mês de junho e processadas da mesma forma que o *H. pernambucensis*. Isto foi realizado porque há trabalhos científicos mostrando que estas espécies possuem grande quantidade de polifenóis totais e flavonóides (CHEN *et al.*, 2003; OLIVEIRA-GARCÍA *et al.*, 2008). Essas plantas são eficientes na

proteção contra danos oxidativos e têm habilidade para estimular a capacidade antioxidante (ESSA & SUBRAMANIAN, 2006; GAUTHAMAN *et al.*, 2006; OBOH & ROCHA, 2008).

O conteúdo de polifenóis totais foi analisado segundo a técnica descrita por SCHWAMBACH *et al.*(2008), imediatamente após a preparação das infusões de *H. pernambucensis*, *H. sabdariffa* e *H. rosa-sinensis*. Foi separado 1ml da infusão em um tubo falcon na concentração de 5% e adicionado 1,5ml HCl 0,1N. Esta solução foi agitada no vórtex por 60 segundos e colocada em banho-maria em temperatura de 25° C por 30 minutos. Após, centrifugou-se a 6000xg, por 1 hora a 4° C e coletou-se o sobrenadante. O pellet foi re-extraído e, ao final, juntado com a primeira extração e completado o volume dos sobrenadantes com 5ml de HCL 0,1N. Para quantificação, foi adicionado 1ml de Na₂CO₃ (carbonato de sódio) 20% e 0,5ml de Folin-Ciocalteu. Realizou-se novamente uma agitação no vórtex por 60 segundos e incubou-se a 100° C por 1 minuto. Ao final, a solução foi filtrada com papel filtro e a absorbância lida com espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visible spectrophotometer) a 750nm. No tubo branco, foram adicionadas todas as soluções com exceção da infusão, acompanhando todos os passos da amostra. Como padrão, foi utilizado o pirogalol diluído em água miliQ que foi mantido ao abrigo da luz e no gelo.

3.8 Medição do Conteúdo de Flavonóides

O conteúdo de flavonóides foi analisado segundo a técnica descrita por SCHWAMBACH *et al.*(2008), imediatamente após a preparação da infusão de *H. pernambucensis*, *H. sabdariffa* e *H. rosa-sinensis*. Para extração de flavonóides, foram colocados 4ml da infusão na concentração de 5% em um tubo falcon e adicionados 5ml de etanol 95%. A solução foi agitada em vórtex por 60 segundos e colocada em banho-maria à temperatura 25°C por 30 minutos no escuro. Após, centrifugou-se a 5000xg por 10 minutos e coletou-se o sobrenadante em uma alíquota de 1 ml a qual foi diluída em 5ml de H₂O miliQ. Para quantificação, foram adicionados 300µl de NaNO₂ (nitrito de sódio)

5%. Agitou-se no vórtex por 60 segundos e incubou-se a 25° C por 5 minutos. Após, foram adicionados 300µl de AlCl₃ (cloreto de alumínio) 1%, seguido por agitação em vórtex por 60 segundos. Logo após, incubou-se a 25° C por 6 minutos e adicionaram-se 2ml de NaOH (hidróxido de sódio) 1M e 2,4ml de H₂O miliQ. Ao final, agitou-se no vórtex por 60 segundos e a absorbância foi lida a 510nm em espectrofotômetro. No tubo branco, foram adicionadas todas as soluções com exceção da infusão e acompanhando todos os passos da amostra. Como padrão, foi utilizada uma solução de rutina em etanol 95% que foi mantida ao abrigo da luz e no gelo.

3.9 Medidas da peroxidação lipídica pelo método de TBARS – Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico

Nesta técnica, a peroxidação lipídica é observada pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com compostos aldeídicos, principalmente o malonaldeído (MDA), presentes nos tecidos, o que resulta na formação de um aduto lido com absorbância a 532nm (HERMES-LIMA & STOREY, 1996; RAMOS, 1999) (figura 15).

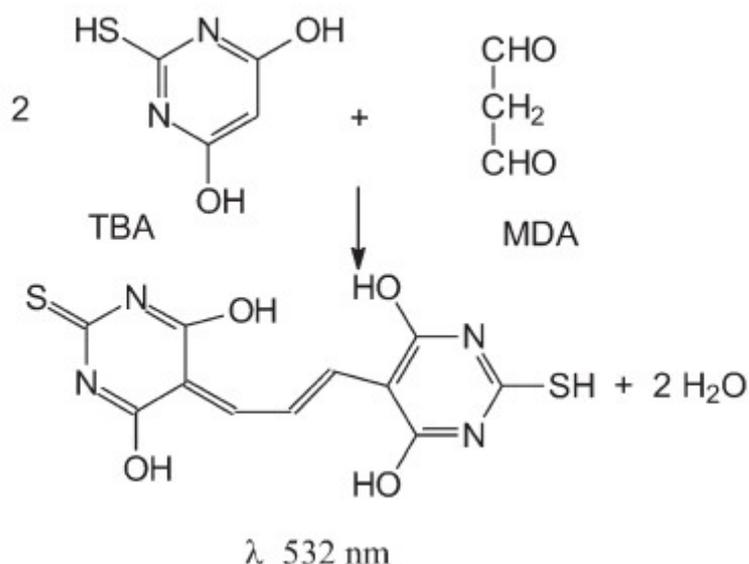


Figura 15. Reação de malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Legenda: ácido tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído (MDA).

Inicialmente, os tecidos foram homogeneizados (homogeneizador vidro-vidro) em ácido fosfórico 0,2%, depois foi acrescido o mesmo volume de ácido fosfórico numa concentração de 2%. A diluição final foi 1:20 (peso:volume). A homogeneização em duas etapas diminui a formação de bolhas.

O material foi sempre mantido no gelo. Depois da homogeneização, um volume de 400µl do homogeneizado foi transferido para tubos contendo 200µl de ácido fosfórico 7% e 400µl de TBA 1% (em NaOH 50mM e BHT 0,1mM). Para o branco, foi utilizado um sistema com 400µl da amostra, 200µl de ácido fosfórico e 400µl de HCl 3mM. Houve uma preocupação com o ajuste do pH sendo sempre mantido a 1,6. Após esta verificação, as amostras foram incubadas a 98° C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente (duração de 10 minutos). Após isso, adicionou-se 1,5 ml de butanol aos tubos e estes foram agitados, no vórtex, por 40 segundos e centrifugados, por 5 minutos, a 1000Xg para se separar a fase orgânica. Esta (superior e rosada) foi retirada e as leituras espectrofotometricamente realizadas a 532 e 600nm. Os resultados foram calculados segundo a fórmula:

$$\text{TBARS} = \frac{(\text{Abs}_{532} \text{ da amostra} - \text{Abs}_{600} \text{ da amostra}) - (\text{Abs}_{532} \text{ do branco} - \text{Abs}_{600} \text{ do branco})}{\text{Coeficiente de Extinção}} \times \frac{1000 \times \text{Dil} \times 1,5}{\text{VH}}$$

O 1,5 são equivalentes ao volume (ml) de butanol colocado para diluição e suspensão dos aldeídos.

O coeficiente de extinção utilizado foi de 156 mM⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em nmol TBARS/g tecido úmido. Este método é eficiente para estudos comparativos (FURTADO-FILHO *et al.*, 2007).

3.10 Danos Oxidativos às Proteínas

As proteínas oxidadas foram determinadas pela medida dos níveis de proteínas carboniladas (adaptada de LENZ *et al.*, 1989). O grupamento carbonil da proteína reage com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNFH), formando um aduto lido com absorvância de 370 nm (FURTADO-FILHO *et al.*, 2007)(Figura 16).

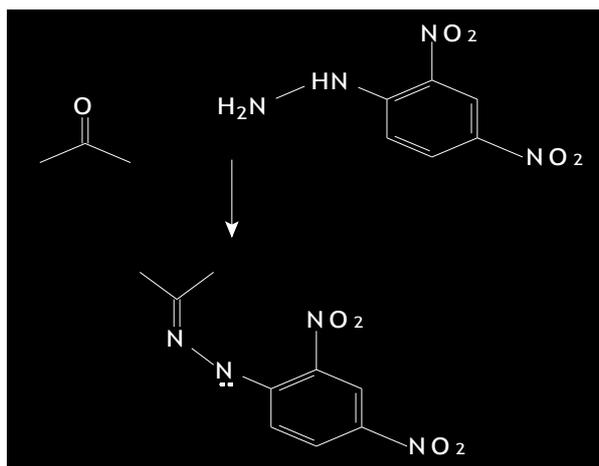


Figura 16. Mecanismos de formação do grupo carbonila (VASCONCELOS *et al.*, 2007)

Uma amostra do fígado e do córtex cerebral foram homogeneizados em ácido sulfossalicílico 5%, numa diluição de 1:20, e centrifugados durante 5 minutos em 13.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, acrescentou-se 500µl de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNFH) 10mM, preparada em 2M de HCl. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por uma hora, sendo agitadas no vórtex a cada 15 minutos (4 vezes) para que ocorresse a reação entre DNFH e os grupos de carbonila. Após este tempo, adicionou-se 500µL de ácido tricloroacético 20%, centrifugou-se em 13.000 RPM, por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. O excesso de DNFH foi retirado, lavando-se o precipitado com 1 ml de etanol: acetato de etila, na proporção de 1:1, depois foi agitado no vórtex por 40 segundos e centrifugado. Esse procedimento de LCD (lavagem, centrifugação e descarte) foi realizado três vezes. As proteínas foram ressuspensas com cloreto de guanidina 6M,

incubadas por 15 minutos e os grupos carbonil foram quantificados, espectrofotometricamente, com anotações da absorbância de 370 nm. O coeficiente de extinção adotado foi de $22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$\text{Ponto de Carbonil} = \frac{(\text{Abs}_{370} \div \text{Coeficiente de Extinção})}{\text{Massa (mg)}}$$

3.11 Avaliação da genotoxicidade pelo Ensaio Cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado conforme descrito por Collins (2004). Inicialmente, foi realizada a pesagem das amostras de tecido (0,0100 a 0,0300g) com o auxílio do nitrogênio líquido. Logo em seguida, estas amostras foram deixadas descongelar em um isopor com gelo e água por 15 minutos. Em uma placa média de Elisa, foi acrescentada 500 μ l de solução de mincing (HBSS com 20mM EDTA, 10% DMSO e pH 7,0-7,5) sobre uma plataforma de gelo. O tecido pesado foi adicionado à solução de mincing e picotado com o auxílio de duas ponteiros de 200 μ l ao abrigo da luz. Então, no escuro, foi coletada uma alíquota de 20 μ l da suspensão de células e dissolvida em 0,75% de agarose de baixo ponto de fusão (90 μ l). Imediatamente, a suspensão e a agarose foram pipetadas em uma lâmina de vidro, pré-revestida com uma camada de 1% de agarose normal, e adicionada à lamínula. A lâmina ficou secando na geladeira por 15 minutos. Após este tempo de secagem, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em cubeta vertical (cobertas por papel alumínio) e incubadas em solução de lise gelada (2,5M NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO e pH 10). Durante a incubação, as lâminas foram protegidas da luz dentro da geladeira por 1 hora, a fim de remover os conteúdos citoplasmáticos e membranas nucleares, deixando o DNA como nucleóides. Depois do procedimento de lise, as lâminas foram colocadas dentro de uma cuba horizontal de eletroforese. Esta cuba horizontal de eletroforese foi colocada dentro de uma bandeja de plástico preenchida com gelo. Em seguida, foi adicionado o tampão para eletroforese

até cobrir as lâminas (300mM NaOH, 1mM EDTA e pH13,0), permitindo que o DNA relaxe e deixe explícito os sítios alcali-lábeis. A eletroforese foi ajustada a um fonte de 25V e 300mA por 20 minutos (a corrente foi controlada com o volume do tampão). Todas as etapas anteriores foram realizadas sob luz amarela ou no escuro, a fim de prevenir danos adicionais ao DNA. As lâminas foram então neutralizadas dentro da cubeta vertical (0,4M Tris e pH 7,5) por 5min e repetido o procedimento por 3 vezes. Posteriormente, as lâminas foram mantidas com água destilada por 5min, descartada a água e repetido o procedimento por mais duas vezes. As lâminas foram secas durante a noite e hidratadas durante 5 minutos em água destilada. Depois foram coradas com solução contendo nitrato de prata, realizada conforme o protocolo descrito por NADIN *et al.* (2001) (figura 17). Após a coloração, as lâminas secaram à temperatura ambiente durante à noite. Finalmente, foram analisadas utilizando um microscópio óptico. Foram selecionadas 100 células de cada lâmina, em triplicada. Estas foram visualmente pontuadas – de acordo com o comprimento da cauda – em cinco classes: classe 0: não-danificada, sem cauda; classe 1: com uma cauda mais curta do que o diâmetro da cabeça (núcleo); classe 2: com um comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda com mais de 2 vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4: cometas sem cabeças (figura 18). Então, o Índice de Danos de cada grupo pesquisado variou de zero (100x0; 100 células completamente sem danos) a 400 (100x4, 100 células observadas com o dano máximo). Na frequência de danos (FD) foram contadas cem células por lâmina em triplicata para cada animal

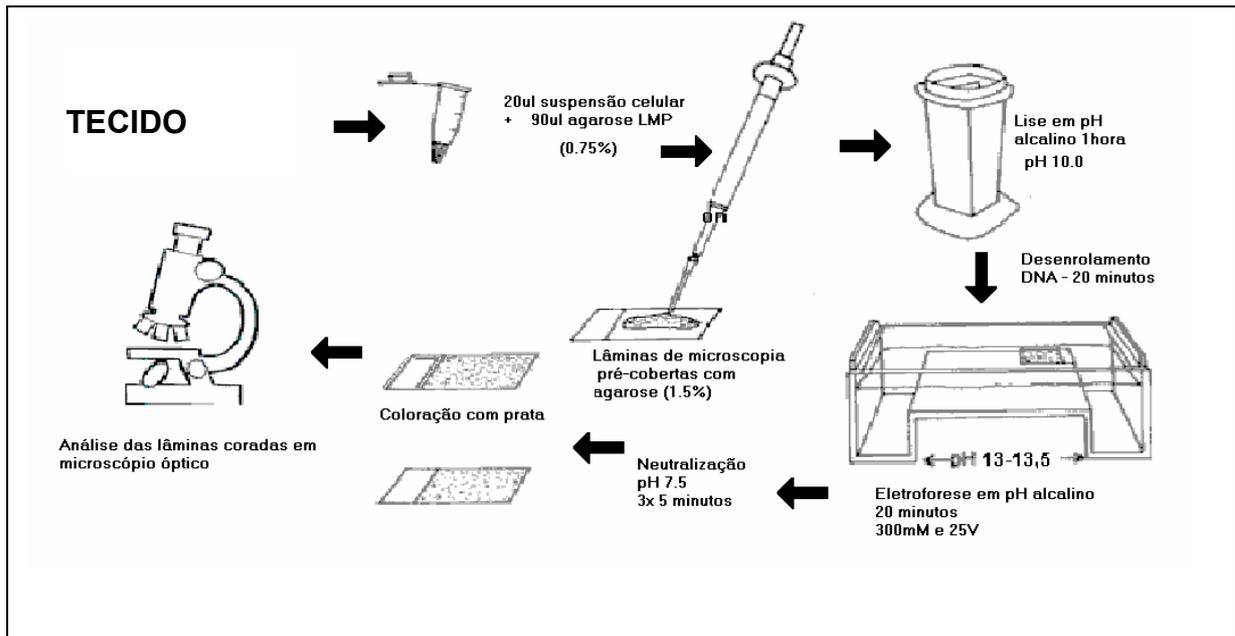


Figura 17. Metodologia do Ensaio Cometa (HARTMANN & SPEIT, 1997).

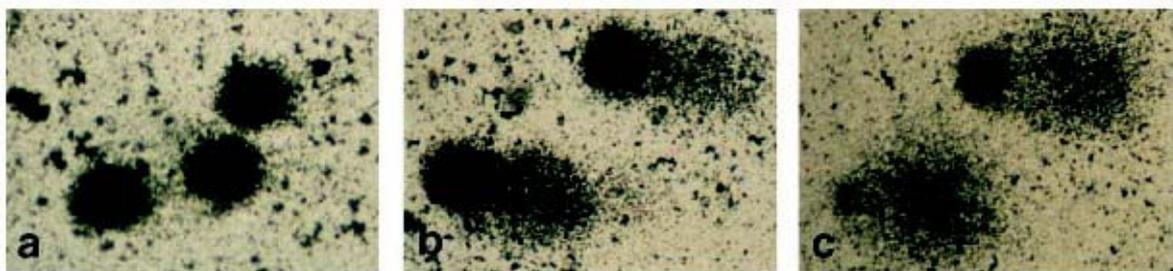


Figura 18. Células do Ensaio Cometa coradas com nitrato de prata. a) classes 0 e 1; b) classes 2 e 3; c) classe 4.

3.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de computador “Mynova” versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). Os dados foram apresentados como médias \pm SEM (Erro Padrão da Média). Para a comparação entre mais de dois grupos diferentes foi usado o teste pós-ANOVA SNK (Student-Newman-Keuls). Para comparação entre dois grupos diferentes

foi realizado o Test-t Student (2 caudas). Foram considerados como significantemente diferentes os valores de p menores que 0,05, para o teste pós-ANOVA SNK e para o Teste-t.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.1.2 Medida da Peroxidação Lipídica

A figura 19 demonstra os resultados das análises de peroxidação lipídica pela método de TBARS, no fígado das ratas expostas (RE) e não expostas (RC) ao campo eletromagnético, bem como das ratas expostas que receberam ou não a infusão de *H. pernambucensis* (REH e RCH, respectivamente) não houve diferença significativa.

Pode-se observar que não houve diferença significativa na medida de TBARS entre o grupo exposto e não exposto, nem entre os que receberam ou não a infusão. Cabe ressaltar que as análises estatísticas foram realizadas comparando-se os quatro grupos entre si e os resultados também não foram significativos.

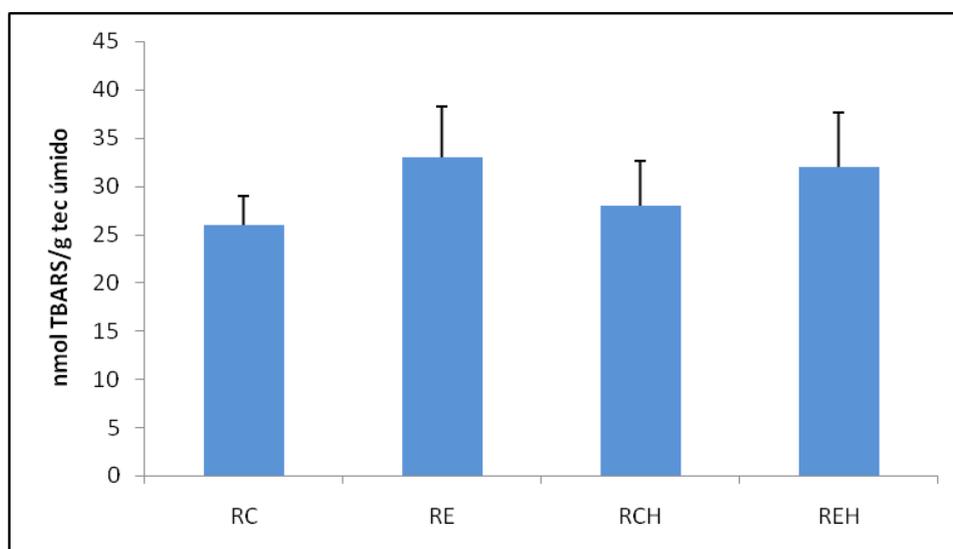


Figura 19. Determinação de peroxidação lipídica do fígado dos animais expostos e não expostos ao campo eletromagnético, tratados ou não com a infusão de *H. pernambucensis*. RC=ratas controle; RE=ratas expostas ao campo eletromagnético; RCH=ratas controle tratadas com a infusão das flores de *HpA*; REH=ratas expostas ao campo eletromagnético tratadas com a infusão das flores de *HpA*. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), n=6. Teste pós-ANOVA SNK (Student-Newman-Keuls) (duas caudas), Não significativo.

4.1.2.1 Córtex Cerebral Direito

Da mesma forma que foi visto no ensaio anterior, os níveis de peroxidação lipídica do córtex cerebral direito (CCD) das ratas expostas (RE) e não expostas (RC) ao CEMUAF, bem como os das ratas expostas que receberam ou não a infusão de *H. pernambucensis* (REH e RCH, respectivamente), não houve diferença (figura 20). Quando se comparam todos os grupos (RE, RCH e REH) com o grupo RC também não são observadas diferenças significativas.

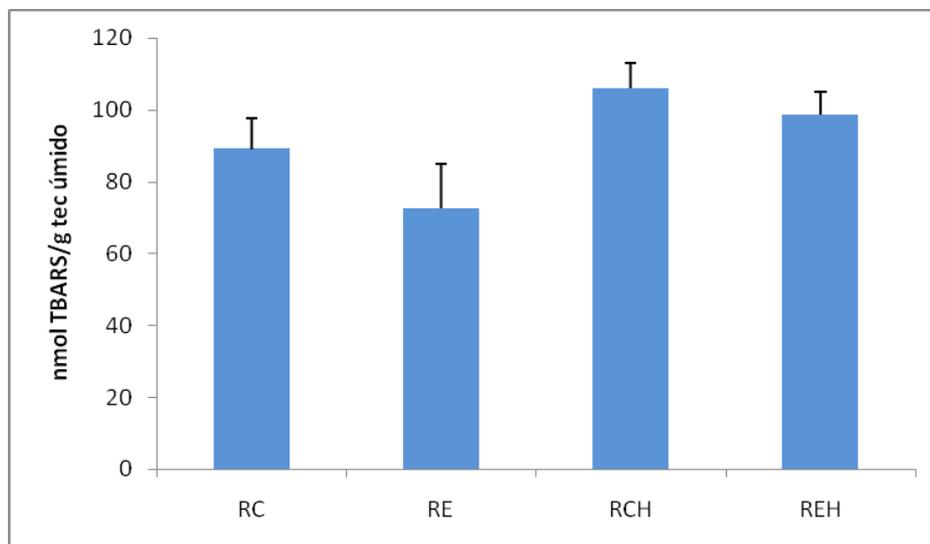


Figura 20. Determinação de peroxidação lipídica de CCD dos animais expostos e não expostos ao campo eletromagnético, tratados ou não com a infusão de *H. pernambucensis* RC=ratas controle; RE=ratas expostas ao campo eletromagnético; RCH=ratas controle tratadas com a infusão das flores de *HpA*; REH=ratas expostas ao campo eletromagnético tratadas com a infusão das flores de *HpA*. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), n=6. Teste pós-ANOVA SNK (Student-Newman-Keuls) (duas caudas), Não significante.

4.1.2.2. Córtex Cerebral Esquerdo

Na figura 21, observa-se que o nível de TBARS do córtex cerebral esquerdo (CCE) das ratas expostas (RE) é significativamente maior do que o grupo controle (RC). Além disso, nos grupos que receberam a infusão das flores de *HpA* (RCH e REH), também houve um aumento significativo na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle (RC).

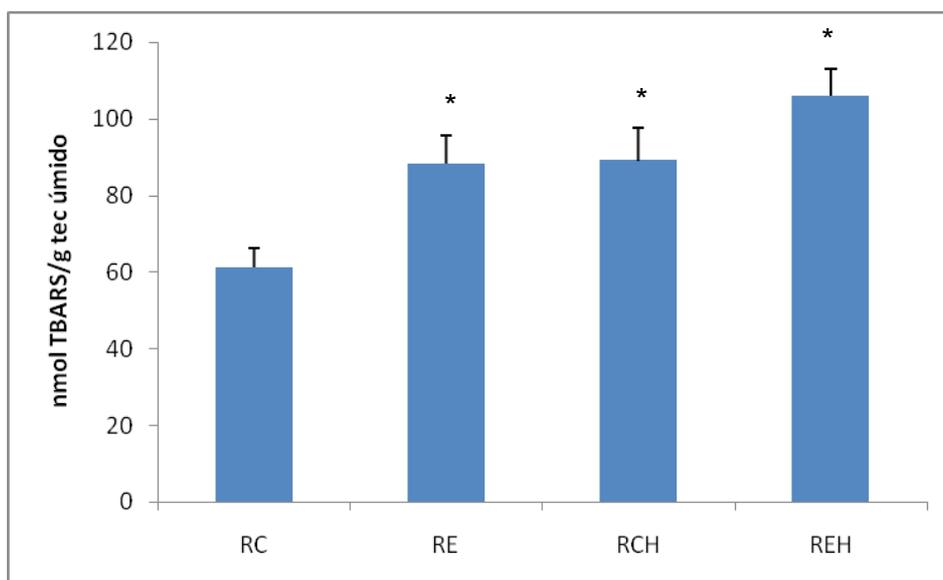


Figura 21. Determinação de peroxidação lipídica de CCE dos animais expostos e não expostos ao campo eletromagnético, tratados ou não com a infusão de *H. pernambucensis* RC=ratas controle; RE=ratas expostas ao campo eletromagnético; RCH=ratas controle tratadas com a infusão das flores de *HpA*; REH=ratas expostas ao campo eletromagnético tratadas com a infusão das flores de *HpA*. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), n=6, * = $p < 0,05$, comparação das RE, RCH e REH com RC. Teste pós-ANOVA SNK (Student-Newman-Keuls) (duas caudas).

4.1.3 DETERMINAÇÃO DE CARBONIL NO CÓRTEX CEREBRAL ESQUERDO

Foi realizado o método de proteínas carboniladas apenas no córtex cerebral esquerdo (CCE) porque não foi verificado aumento da peroxidação lipídica no córtex cerebral direito (CCD).

Conforme pode ser observado na figura 22, o nível de proteínas carboniladas do CCE no grupo das ratas expostas (RE) aumentou de forma significativa em relação ao grupo controle (RC). No entanto, no grupo das RCH e REH, quando comparado ao grupo das RE, houve diferença, mas com níveis menores de oxidação de proteínas (figura 22). Quando se comparam os grupos das RCH e REH com o grupo das RC, não se observa diferença significativa.

Entretanto, o grupo exposto que recebeu a infusão de *Hibiscus* (REH) teve os níveis de proteínas carboniladas (PC) reduzidos de forma significativa, quando comparados ao grupo RE, indicando assim que a infusão das flores de *HpA* associado ao CEMUAF protegeu o CCE de lesões a proteínas. Pode-se observar que os níveis de PC nos grupos RCH e REH foram praticamente iguais aos níveis do grupo RC e que o CEMUAF de 950MHz foi prejudicial ao CCE, aumentando o dano oxidativo em proteínas carboniladas das RE.

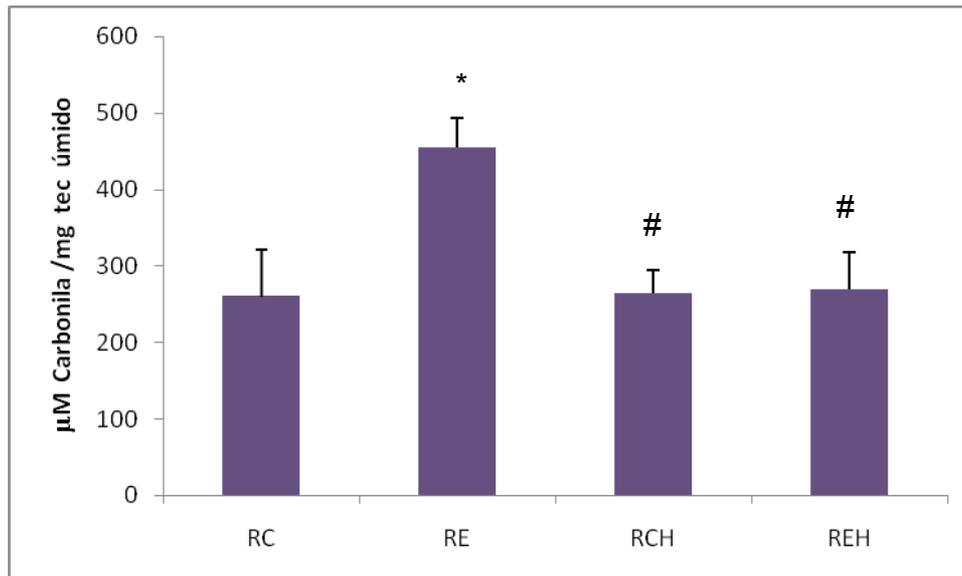


Figura 22. Determinação de proteínas carboniladas de CCE dos animais expostos e não expostos ao campo eletromagnético, tratados ou não com a infusão de *H. pernambucensis*. RC=ratas controle; RE=ratas expostas ao campo eletromagnético; RCH=ratas controle tratadas com a infusão das flores de *HpA*; REH=ratas expostas ao campo eletromagnético tratadas com a infusão das flores de *HpA*. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), $n=6$, $*= p<0,05$, comparação das RE, RCH e REH com RC; $\# = p<0,05$, comparação das RCH e REH com RE. Teste pós-ANOVA SNK (Student-Newman-Keuls) (duas caudas).

4.2 ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE NO CÓRTEX CEREBRAL ESQUERDO POR ENSAIO COMETA

A genotoxicidade foi avaliada pelo índice de danos e frequência de danos medidos pelo Ensaio Cometa no córtex cerebral esquerdo dos grupos de ratas expostas (RE) e não expostas (RC) ao campo eletromagnético, bem como nos das ratas expostas que receberam ou não a infusão das flores de *HpA* (REH e RCH, respectivamente).

Observa-se, na tabela 1, que houve diferença significativa no Índice de Danos entre RE, RCH e REH, quando comparado ao RC. Além disso, observa-se uma diminuição significativa no índice de danos do grupo REH quando comparado ao seu RCH.

Tabela 1. Determinação do índice de danos pelo Ensaio Cometa de CCE.

Amostras	Índice de Danos (0-400)
RC	184,06 ± 18,80
RE	275,41 ± 16,06*
RCH	239,56 ± 17,97*
RE	154,00 ± 19,89 ^{a,b}

Os resultados são apresentados como média ± SEM (Erro Padrão da Média), n=6, *=p<0,05 comparação das RE, RCH e REH com RC; **a**=p<0,05 comparação das RE com REH; **b**=p<0,01 comparação das RCH com REH. Teste pós-ANOVA SNK (Student-Newman-Keuls) (duas caudas). RC=ratas controle; RE=ratas expostas ao campo eletromagnético; RCH=ratas controle tratadas com a infusão das flores de *HpA*; REH=ratas expostas ao campo eletromagnético tratadas com a infusão das flores de *HpA*.

4.2.1 Freqüência de danos do Ensaio Cometa por classes de danos

A freqüência de danos é avaliada pelo somatório das células que apresentaram danos e também pode ser distribuída por classes de danos. Observa-se que houve um aumento significativo na freqüência de células com as classes 3 e 4 e uma diminuição no número de células com danos da classe 1 no grupo das ratas expostas (RE) quando comparado ao grupo das ratas controles (RC) (figura 23).

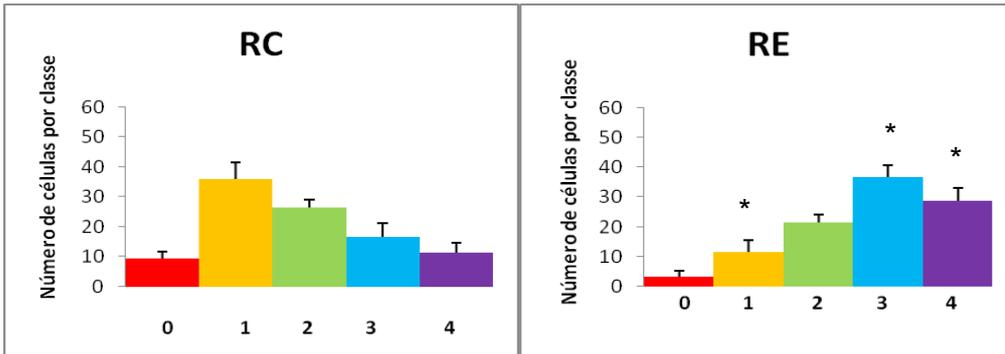


Figura 23. Determinação da freqüência de danos do Ensaio Cometa por número de células por classes de danos em CCE dos animais expostos e não expostos ao campo eletromagnético. RC=ratas controle; RE=ratas expostas ao campo eletromagnético. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), $n=16-17$, * = $p<0,05$, comparação das classes 1, 2,3 e 4 do grupo RC com as classes correspondentes do grupo RE. Teste-T de Student (duas caudas).

É interessante observar que o grupo controle que recebeu a infusão apresenta um número elevado de células da classe 3 e 4. No grupo das ratas expostas que tomaram a infusão (REH), houve uma diminuição significativa na freqüência de células correspondentes às classes 3 e 4 e uma maior incidência da classe 1 quando comparado as ratas controle que tomaram a infusão (RCH) (figura 24).

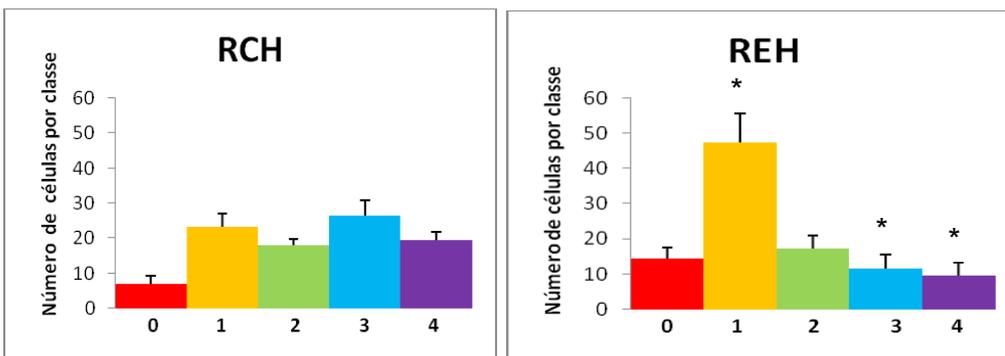


Figura 24. Determinação da freqüência de danos do Ensaio Cometa por número de células por classes de danos em CCE dos animais expostos e não expostos ao campo eletromagnético que tomaram a infusão de HpA. RCH=ratas controle que tomaram a infusão de HpA; REH=ratas expostas ao campo eletromagnético que tomaram a infusão de HpA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM (Erro Padrão da Média), $n=16-11$, * = $p<0,05$, comparação das classes 1, 2,3 e 4 do grupo RCH com as classes correspondentes do grupo REH. Teste-T de Student (duas caudas).

4.3 CONTEÚDO DE POLIFENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES

Os conteúdos de Polifenóis Totais de *H.rosa-sinensis* e *H.pernambucensis* foram maiores que os de *H.sabdariffa*. O *H.pernambucensis* apresentou 1,7 vezes mais Polifenóis Totais que *H.sabdariffa*. Quando se compara os Flavonóides, observou-se que o *H.pernambucensis* tem menor quantidade que *H.sabdariffa* (3,5 vezes menos). Também quando se compara *H.rosa-sinensis* com *H.pernambucensis*, observou-se que *H.pernambucensis* apresentou menos quantidade de Flavonóides (2,4 vezes menos).

Tabela 2. Determinação de Polifenóis Totais e Flavonóides das infusões *H.sabdariffa*, *H.rosa-sinensis* e *H.pernambucensis*.

Amostras	Polifenóis Totais (mg/ml)	Flavonóides (mg/ml)
<i>H.sabdariffa</i> L.	4,77 ± 0,403	0,05 ± 0,004
<i>H.rosa-sinensis</i> L.	8,60 ± 0,171*	0,03 ± 0,004*
<i>H.pernambucensis</i> A.	8,26 ± 0,330*	0,01 ± 0,003 ^a

Os resultados de Polifenóis Totais são apresentados como média ± SEM, n=7. * = p<0,005, comparação do *H.rosa-sinensis* e *H.pernambucensis* com *H.sabdariffa*. O conteúdo de Flavonóides os resultados são apresentados como média ± SEM, n=7. * = p<0,005, comparação do *H.rosa-sinensis* e *H.pernambucensis* com *H.sabdariffa* ^a = p<0,005, comparação do *H.pernambucensis* com o *H.rosa-sinensis*. Teste SNK (Student-Newman-Keuls) (duas caudas).

5. DISCUSSÃO

O campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência (CEMUAF) tem sido relacionado a danos neuronais, ocasionando extravasamento da albumina pela barreira hematocefálica e alterando os neurônios do córtex em ratos machos e fêmeas (SALFORD *et al.*, 2003). A redução da capacidade cerebral pode ocasionar doenças neuronais como o desenvolvimento de tumores cerebrais malignos (HARDELL *et al.*, 2009) e danos oxidativos (MOUSTAFA *et al.*, 2001; ZMYSLONY *et al.*, 2004; SIMKO *et al.*, 2006; ARTHUR, 2007, VALKO *et al.*, 2007, PHILLIPS *et al.*, 2009). Para MERAL *et al.* (2007) o campo eletromagnético emitido por telefone móvel induz estresse oxidativo em tecido cerebral, aumentando os níveis de malonaldeído, catalase e glutatona reduzida *in vivo*.

Sabe-se que o gênero *Hibiscus* tem habilidade de restaurar os níveis de antioxidantes (MOHAMADOU *et al.*, 2007) e proteger contra os danos oxidativos (LIU *et al.*, 2006). Esta proteção é devido à presença das propriedades antioxidantes provenientes do ácido protocatênico, antocianina, vitamina E e compostos fenólicos presentes em diversas espécies deste gênero (MAGANHA *et al.*, 2009). Em função dessas propriedades ativas, a medicina tradicional utiliza esse gênero para vários benefícios à saúde como anti-hipertensivo, cardioprotetor, anti-inflamatório, antitumoral entre outros (SERRAME *et al.*, 1995; ODIGIE *et al.*, 2003; AJAI *et al.*, 2007; HERRERA-ARELLANDO *et al.*, 2007).

Este trabalho teve como principal objetivo verificar os efeitos das ondas eletromagnéticas de ultra-alta-freqüência (CEMUAF) e a provável ação antioxidante da infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* Arruda sobre o fígado e o córtex cerebral de ratas Wistar que passaram pela gestação e lactação.

Na análise de peroxidação lipídica pelo método de TBARS, não foi observada alteração significativa tanto no fígado (figura 19) quanto no córtex cerebral direito (CCD) (figura 20) de ratas expostas que receberam ou não a infusão das flores de *Hibiscus pernanbucensis*. Sabe-se que o equilíbrio entre oxidante e antioxidante é o resultado da produção de ERO e os vários tipos de “scavengers” e enzimas antioxidantes (DRÖGUE, 2002; HALLIWEL,2008). É bem provável que o fígado e o córtex cerebral direito estejam em situação de equilíbrio. Os compostos presentes na infusão das flores de *H.pernambucensis* não provocaram diminuição nem aumento dos danos oxidativos no fígado e CCD. Entretanto, foram verificados maiores níveis da peroxidação lipídica no córtex cerebral esquerdo (CCE) dos grupos das RE quando comparados ao grupo das RC (figura 21). O nível de proteínas oxidadas, medido pelas proteínas carboniladas, também foi maior no córtex cerebral esquerdo das ratas expostas ao CEMUAF quando comparadas às ratas controles (figura 22). Esta resposta diferente observada entre o CCD e CCE pode estar relacionada à diferença da morfofisiologia dos hemisférios.

Conforme mencionado por OLIVEIRA (2005), em humanos, 95% das pessoas apresentam o hemisfério esquerdo como dominante. Este hemisfério é considerado mais objetivo e responsável pelo raciocínio lógico, enquanto que o hemisfério direito é subjetivo e responsável pela criatividade, imaginação e percepção. Em razão da existência da área de Broca (localizada na parte inferior do lobo frontal e na parte superior posterior do lobo temporal) e da área de Wernicke (localizada na região interna medial), o hemisfério esquerdo é considerado dominante. A área de Broca é responsável pela capacidade de expressão. Os estímulos captados pelas outras áreas (visão, audição, olfato) convergem para a área de Wernicke. Esta é ativada, sendo responsável pela interpretação geral dos estímulos (OLIVEIRA, 2005). BARON-COHEN (2004) relata que o hemisfério esquerdo feminino tem maior atividade cerebral, aumento do fluxo sanguíneo e da atividade metabólica quando estimulado por tarefas de fala. O fato do CCE ser metabolicamente mais ativo, e a associação do campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência pode ter induzido à formação de ERO no CCE das ratas, provocando a indução de estresse oxidativo (MOUSTAFA *et al.*, 2001; ORAL *et al.*, 2006).

Corroborando com os nossos resultados, SOKOLOVIC *et al.* (2008) relataram que a frequência UHF de 900MHz causou dano oxidativo no cérebro de ratos Wistar aumentando os níveis de proteínas carboniladas, malonaldeído, atividade da xantina oxidase e diminuição da atividade da catalase. Em consequência disso, os efeitos diretos são a perda de fluidez, diminuição na resistência elétrica, depressão na mobilidade de proteína na membrana e intercâmbio maior entre os fosfolípidios da membrana plasmática. Nos efeitos indiretos, a peroxidação lipídica que é possivelmente menos aparente, mas provavelmente não menos prejudicial, forma aldeídos, epóxidos e cetonas no cérebro.

REFSGAARD *et al.*(2005) relacionaram que os efeitos fisiológicos associados com o estresse oxidativo poderiam formar produtos de peroxidação lipídica (hidroperóxidos lipídicos e derivados de aldeídos). Estes são capazes de induzir a formação de grupos carbonil *in vivo* e *in vitro* elevando os danos oxidativos às proteínas. Pode-se deduzir que a geração de ERO por CEMUAF, aliado à fisiologia do córtex cerebral esquerdo (contém maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados), tenha induzido ao aumento da peroxidação lipídica e de proteínas carboniladas no CCE.

No presente estudo, o CEMUAF também ocasionou um aumento dos danos no DNA do grupo exposto (RE) em relação ao controle (RC), quando medido pelo Ensaio Cometa (tabela 1). ONUKI *et al.*(2002) mostraram que as ERO e os aldeídos são agentes importantes para lesão do DNA, podendo levar a mutações que estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer. Então, os maiores níveis de danos oxidativos encontrados em lípidios das RE podem ter originado produtos aldeídicos que levaram a maiores índices de danos ao DNA. Conforme PHILLIPS (2009), a radiação de radiofrequência é genotóxica no cérebro de ratos expostos, aumentando a quebra do DNA.

Na análise da frequência de danos, por meio da quantificação de células por classe de danos, verificaram-se que as ratas expostas apresentam células com as classes mais altas de danos em DNA (tipo 3 e 4) em comparação as ratas controles (figura 23). KESARI & BEHARI (2009) também observaram aumento no número de quebras de DNA nos ratos expostos,

sugerindo um aumento nas quebras duplas que foram cumulativas e não reparadas eficientemente pelo sistema de reparo.

Os animais que tomaram a infusão das flores de *H. pernambucensis* e não foram expostos ao CEMUAF (RCH) e os que foram expostos ao CEMUAF (REH) apresentaram maior peroxidação lipídica no córtex cerebral esquerdo, ao invés de serem protegidos (figura 21). Isto pode ter acontecido pela grande quantidade de ferro (227mg/kg de planta, limite estabelecido na literatura 20-1000mg/Kg) e cobre (16mg/kg de planta, limite estabelecido na literatura 20mg/Kg) presentes nas flores da planta (TABATAI & BREMNER, 1970; BREMNER & MULVANEY, 1982), quando comparada às outras plantas do mesmo gênero como, por exemplo, o *H. sabdariffa* (117mg/kg de planta) (FALADE *et al.*, 2005). Como a planta tem elevadas quantidades de ferro e cobre, estes podem ter servido como agentes doadores de elétrons para o H₂O₂, tentando reduzi-lo e formando o radical hidroxil (:OH) via da reação de Fenton (FURTADO-FILHO, 2003). Este radical é extremamente reativo e nocivo reagindo indiscriminadamente com outras moléculas. A sua meia vida é de 7x10⁻⁴ segundos, danificando as moléculas próximas de onde é gerado (AUGUSTO, 2006).

Pode-se também inferir que a administração da infusão das flores de *H.pernambucensis*, na concentração de 5%, tenha induzido um maior dano oxidativo em lipídios, agindo como um oxidante e não como antioxidante.

ROSA *et al.* (2006 e 2007) encontraram que o extrato metanólico de *H.pernambucensis* (em concentrações de 0,001-0,1mg/ml) apresenta atividade antioxidante em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e células V79 diante de H₂O₂ e hidroperóxido de tert-butil. Não se pode descartar a possibilidade de que em uma concentração menor que 5%, a infusão poderia ter agido melhor na defesa antioxidante do córtex cerebral esquerdo dos grupos das RCH e REH.

Na verdade, o córtex cerebral esquerdo das ratas expostas ao CEMUAF que tomaram a infusão das flores de *H. pernambucensis* (REH) mostrou uma menor oxidação de proteínas (figura 22) e uma diminuição nos danos ao DNA (figura 24), quando comparado ao grupo das RCH. Uma hipótese provável é que o CEMUAF, aliado à infusão, tenha potencializado o

sistema proteolítico dependente de ubiquitina no REH, diminuindo as proteínas oxidadas (HERSHKO & CIECHANOVER, 1992; CHONDROGIANNI & GONOS, 2008). IIHAM *et al.* (2004) demonstraram que a administração de *Ginkgo biloba* concomitante à exposição de ondas eletromagnéticas de ultra-alta-freqüência, induzem aumento na atividade de SOD em tecido cerebral de ratos.

Conforme mencionado acima, o CCE é metabolicamente mais ativo que o CCD, e dessa maneira, também não se pode excluir a possibilidade de haver um aumento das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, ou até mesmo a própria glutathione, neste hemisfério cerebral. Portanto, é possível que o CEMUAF tenha induzido o aumento da atividade da superóxido dismutase nos animais e, dessa forma, diminuindo a quantidade de proteínas oxidadas e lesões no DNA.

A quantidade de polifenóis (8,25mg/ml) e flavonóides (0,010mg/ml) (tabela 2) não foi suficiente para quelar a maior quantidade de ferro e cobre presentes na infusão, não protegendo o córtex cerebral esquerdo do grupo RCH e REH contra o aumento de peroxidação lipídica. Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade de serem os responsáveis pela diminuição nos danos a proteínas e ao DNA, quando combinado com o CEMUAF.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As perguntas avaliadas neste trabalho foram as seguintes: (1) O CEMUAF de 950MHz causa aumento de danos oxidativos em ratas expostas durante a gestação e lactação? (2) A infusão das flores de *H. pernambucensis* protege as ratas expostas ao CEMUAF durante a gestação e lactação?

Para responder a essas perguntas, foram analisados os níveis de TBARS, proteínas carboniladas e o índice de danos em DNA no fígado e no córtex cerebral desses indivíduos. Além disso, foram quantificados os níveis de polifenóis totais e os de flavonóides na infusão de *H. pernambucensis*. Esperava-se encontrar maiores danos oxidativos nas RE e menores em RCH e REH quando comparados às RC conforme a proteção antioxidante que o gênero *Hibiscus* possui. Contava-se também que a quantidade de polifenóis totais e de flavonóides do *H. pernambucensis* fossem proteger os órgãos das ratas pelas suas propriedades fitoquímicas.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o CEMUAF de 950MHz não causa aumento de danos oxidativos em lipídios de fígado e CCD de RE quando comparadas às RC. Diferentemente, o CEMUAF causa aumento de peroxidação lipídica no CCE de RE.

A infusão das flores de *H. pernambucensis* não é capaz de proteger contra danos oxidativos a lipídios de fígado e CCD. Observou-se um aumento da peroxidação lipídica no CCE das ratas que receberam a infusão, em relação ao grupo controle.

O CEMUAF causa aumento de danos oxidativos em proteínas e lesões no DNA de CCE em ratas expostas.

A infusão de *H. pernambucensis* não protege contra danos oxidativos em proteínas no córtex cerebral esquerdo das RCH. Há aumento de danos em DNA em CCE após a ingestão da infusão nas RCH.

Ao contrário disso, o CEMUAF aliado à infusão causou diminuição de danos em DNA no CCE quando se comparam REH com RE e RCH.

Em relação a outras espécies, a infusão de *H. pernambucensis* tem mesma quantidade de polifenóis que *H. rosa-sinensis* e mais que *H. sabdariffa*.

Contrariamente, há uma menor quantidade de flavonóides que essas duas espécies.

Tendo em vista os resultados apresentados, não é recomendável o consumo da infusão das flores de *H. pernambucensis* (na concentração de 5%) para fins de suplementação de antioxidantes na gestação e lactação. Além disso, a utilização de CEMUAF de 950MHz causa estresse oxidativo e é genotóxico no córtex cerebral esquerdo as ratas nesta fase, o que pode possivelmente acontecer com mulheres.

Futuramente, pretende-se analisar a atividade dos antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST) no córtex cerebral esquerdo das ratas expostas ao CEMUAF.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDABBO, F.; MONTAGNANI, M. & GOLIGORSKY, M.S. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53(6):885-92,2009.

AGBOR, G.A.; OBEN, J.E.; NGOGANG, J.Y.; XINXING, C. & VINSON, J.A. Antioxidant capacity of some herbs/spices from Cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53:6819-6824, 2005b.

AHERNE, S.A., & O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. *Nutrition. New York*, 18(1): 75-81, 2002.

AHMAD, S. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. *Chapman in Hall*, New York, NY. 238-272, 1995.

AJAY, M.; CHAI, H.J.; MUSTAFA, A.M.; GILANI, A.H. & MUSTAFA, M.R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *Journal of Ethnopharmacology*, 109:388-393, 2007.

ALAM, M.M.; SIDDIQUI, M.B. & HUSSAIN, W. Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. *Fitoterapia*, 61:240-242, 1990.

ALI, S.; SINGH, P. & THOMSON, R.H. Naturally occurring quinones 28 Sesquiterpenoid quinones and related compounds from *Hibiscus tiliaceus*. *Journal of Chemical Society Perk T.*, 1(1):257-259, 1980.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K. & HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science*, 90:7915-7922, 1993.

ANDERSON, U.; LEIGHTON, B.; YOUNG, M. E; BLOMSTRAND, E. & NESWSSHOLME, E.A. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.*, 249: 512-516, 1998.

ANON. Available: <http://www.ibiblio.org/herbmed/eletric/kings/hibiscus.html>, 2003b.

ARTHUR, J.S.C. MAPK activation by radio waves. *Biochem. J.*, 405:e5-e6, 2007.

ARZALUZ, I.O & JONES R.W. Ecology and Phenology of the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) on an Unusual Wild Host, *Hibiscus pernambucensis*, in Southeastern Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 6:1405-1412, 2001.

AUGUSTO, O. Radicais livres: bons, maus e naturais. Oficina de textos, São Paulo, 2006.

BAKER, S.K. & TARNOPLSKI, M.A. Targeting cellular energy production in neurological disorders. *Expert. Opin Investig Drugs*, 12:1655-1679, 2003.

BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G. DE & AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim. Nova*, 29(6):1352-1360, 2006.

BARON-COHEN, S. Diferença essencial: verdade sobre o cérebro de homens e mulheres. *Editora Abreu's System Ltda*, ISBN 85-7302-607-3, 203p, 2004.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G. & BIANCHI, M. DE L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim.Nutri.*, Araraquara, 15(3):285-295, 2004.

BELL, T.W. Morphological and chemical differences among populations of *Hibiscus tiliaceus* along an elevational gradient in Moorea, French Polynesia. *Water Resources Center Archives Biology and Geomorphology of Tropical Islands (ESPM 107/1B 158)*, University of California, Multi-Campus Research Unit, 2006.

BERNHART, J.H. Non-ionizing radiation safety: Radiofrequency radiation, electric and magnetic fields. *Physics on Medicine and Biology*, 37(4):807-844, 1992.

BIANCHI, M. DE L.P. & ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, Campinas, 12(2):123-130, 1999.

BISHT, K.S.; MOROS, E.G.; STRAUBE, W.L.; BATY, J.D. & ROTI, J.L.R. The effect of 835.62MHz FDMA or 847.74MHz CDMA modulated radiofrequency radiation on the induction of micronuclei in C3H 10T 1/2 cells. *Radiat. Res.*, 157:506-515, 2002.

BOHR, V.A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(9):804-812, 2002.

BREMNER, J.M. & MULVANEY, C.S. Nitrogen total methods of soil analysis, part 2, 2nd Ed., *Agronomy series*, Madison, Wisc.: ASA, 9:595-624, 1982.

BURNS, J. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago, 49:5797-5808, 2001.

CADENAS, E. Mechanism of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: *Oxidative Stress and antioxidant Defenses in Biology* (Ahmad, S., Ed), *Chapman & Hall*, 1-61, 1995.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Ver. Biochem.* 58:79-110, 1989.

[CALABRESE, V.](#); [SCAPAGNINI, G.](#); [COLOMBRITA, C.](#); [RAVAGNA, A.](#); [PENNISI, G.](#); [GIUFFRIDA, S.A.M.](#); [GALLI, F.](#) & [BUTTERFIELD, D.A.](#) Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. *Amino Acids.* , 25:437-44, 2003.

CATHERINE, A.; RICE-EVANS & PACKER, L. Flavonoids in health and disease. 2^a Ed. *Revised and Expanded*. New York/Basel. Copyright, 2003 by Marcel Dekker.

CERQUEIRA, F.M.; GENNARI, M.H. & AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova.*, 30(2):441-449, 2007.

CHEN, Y.; MILLEW, A. & GRISHAM, M.B. Pathophysiology and oxygen metabolites. In: *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Editado por S. Ahmad Chapman & Hall, 238-272, 1995.

CHEN, C.C.; HSU, J.D.; WANG, S.F.; CHIANG, H.C.; YANG, M.Y.; KAO, E.S.; HO, Y.C. & WANG, C.J. Hibiscus sabdariffa Extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J. agric. Food Chem.*, 51:5472-5477, 2003

CHEN, C.C.; CHOU, F.; HO, W.L.; LIN, W.L.; WANG, C.P. & KAO, S. Inhibitory effects of Hibiscus sabdariffa L extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats. *J. Sci. Food and Agri.*, 84:1989–1996, 2004.

ÇİMEN, M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390:1-11, 2008.

COE, F.G. Rama midwifery in eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 117:136-157, 2008.

COGNI, R.; FREITAS, A.V.L. & OLIVEIRA, P.S. Interhabitat differences in ant activity on plant foliage: anta t extrafloral nectaries of Hibiscus pernambucensis in Sandy and mangrove forests. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 107:125-131, 2003.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann. International Med.*, 111:918-931, 1989.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26:249-261, 2004.

COOKE, M.S & EVANS, M.D. REACTIVE OXYGEN SPECIES FROM DNA DAMAGE TO DISEASE. *Science & Medicine*. 10(2):98-111, 2005.

CRAIG, R.E. & LEX, A.J.T. Hibiscus tiliaceus (beach hibiscus). Species profiles for pacific Island Agroforestry. www.traditionaltree.org. ISBN 0970254458, 2006.

CUNHA, A.P.DA. O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente. Capítulo do livro “plantas aromáticas em Portugal – Caracterização e Utilização”. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian – Lisboa, 2007.

CURTIN, K.D.; ZHANG, Z. & WYMAN, R.J. Gap junction proteins are not interchangeable in development of neural function in the Drosophila visual system. *J. Cell Sci.*, 17, 2002.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P. & CAPUTI, A.P. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 53:135-159, 2001.

CZERNICHOW, S. & HERSBERG, S. Interventional studies concerning the role of antioxidant vitamins in cardiovascular disease: a review. *J Nutr Health Aging*, 5:188–195, 2001.

DEGÁSPARI, C.H. & WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5(1):33-40, 2004.

DARLEY-USMAR, V.M.; MASON, W.C.; HOGG, N. & KALYANARAMAN, B. Lipid peroxidation and cardiovascular disease. In: Immunopharmacology of free radical species. Editado por D. Blake and P.G. Winyard; *Academic Press*, Londres, 23-38, 1995.

DEAN, E.T.; FU, S.; STOCKER, R. & DAVIES, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 324:1-18, 1997.

DE JING, A. PLAT, J. & MENSINK, R. Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J. Nutr. Biochem.*, 14:362-369, 2003.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M. M. & SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:194-200, 1991.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95, 2002.

EBLEM, A. Radiações não-ionizantes: conceitos, riscos e aplicações. Curso de Eng. Seg. Trabalho. URL: www.prorad.com.br/rni.htm, 2006.

ESSA, M.M. & SUBRAMANIAN, P. Hibiscus sabdariffa affects ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *eCAM Advance Access*, 1-6, 2006.

FALADE, O.S.; OTEMUYIWA, I.O.; OLADIPO, A.; OYEDAPO, O.O.; AKINPELU, B.A. & ADEWUSI, S.R.A. The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 102:15-22, 2005.

- FALLER, A.L.K. & FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 43(2):211-8, 2009.
- FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUZA, I.M. DE & RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *Construindo a História dos Produtores Naturais, MultiCiência*, (7), 2006.
- FRANCIS, J.K. Research Forester, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, Jardín Botánico Sur, 1201 Calle Ceiba, San Juan PR 00926-1119, in cooperation with the University of Puerto Rico, Río Piedras, PR 00936-4984, 2009. www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201:1203-1209, 1998.
- FRYXELL, P.A. Talipariti (Malvaceae), a segregate from *Hibiscus*. *Contributions of University of Michigan Herbarium*, 23:225-270, 2001.
- FURTADO-FILHO, O.V. Estresse oxidativo no Jacaré-do-Pantanal Caiman yacare. *Dissertação*, UNB, Brasília, 2003.
- FURTADO-FILHO, O.V.; POLCHEIRA, C.; MACHADO, D. P.; MOURÃO, G. & HERMES-LIMA, M. Selected oxidative stress markers in a South American crocodilian species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146:241-254, 2007.
- GAUTHAMAN, K.K.; SALEEM, M.T.S.; THANISLAS, P.T.; PRABHU, V.V.; KRISHNAMOORTHY, K.K.; DEVARAJ, N.S. & SOMASUNDARAM, J.S. Cardioprotective effects of the *Hibiscus rosa sinensis* flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:32, 2006.
- GILGUM-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z. & MELAMED, E. Antioxidant therapy in acute central nervous injury: current state. *Pharmacology Review*, 54:271-284, 2002.
- GÜRBÜZ, I.; ÜSTÜN, O.; YESILADA, E.; SEZİK, E. & KUTSAL, O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 88:93-97, 2003.
- [GUTTERIDGE, J.M.](#) & [HALLIWELL, B.](#) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.*, 899:136-147, 2000.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280:1-8, 1990.

HALLIWELL, I.B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3ed. London: Oxford University Press, 2000.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467:107-112, 2008.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc. Trans.* 35:1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 46:531-542, 2009.

HARDELL, L.; CARLBERG, M. & MILD, K.H. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. *Pathophysiology*, 16: 113–122, 2009.

HARTMANN, A. & SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in the single cell gel test (comey assay). *Toxicol. Lett*, 90:183-188, 1997.

HERMES-LIMA, M. & STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.*, 268:R1386-R1393, 1995a.

HERMES-LIMA, M. & STOREY, K. B. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipens*. *Am J. Physiol.*, 271:R545-R553, 1996.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120: 437-448, 1998.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Editor: Kenneth B. Storey, John Wiley & Sons, New York, 2004.

HERRERA-ARELLANO, A.; MIRANDA-SANCHEZ, J.; VILA-CASTRO, P.; HERRERA-ALVAREZ, S.; JIMÉNEZ-FERRER, J.E. & ZAMILPA, A. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Med*, 73:6–12, 2007.

HERSHKO, A. & CIECHANOVER, A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Ver. Biochem.*, 61:761-807, 1992.

HEY HOOD. Flowering plants of the world. London & Sydney: Croom Helm Publishers., 335, 1985.

HIRUNPANICH, V.; UTAIPAT, A.; MORALES, N.P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SATO, H.; HERUNSALE, A. & SUTHISISANG, C. Hypocholesterolemic and

antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology.*, 103:252-260, 2006.

HOLDWORTH, D.; WAMOI, B. Medicinal plants of the admiralty Island, Papua New Guinea, Part.I. *Journal of Crude Drug Research*, 20(4):169-181, 1982.

ICNIRP GUIDELINES. 2009. Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz). 1-372, 2009.

IHAM, A.; GUREL, A.; ARMUTCH, F.; KAMISLI, S.; IRAZ, M.; AKYOL, O.; OZEN S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta*, 340:153-162, 2004.

ISCHIROPOULOS, H. From physiology to pathology: maintenance of the critical balance by antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:431, 1992.

JADIDI, M. ; FIROOZABAD, S. M. P.; RSHIDY-POUR, A. ; BOLOURI, B. & FATHOLLAHI, Y. Low-power density of 950 MHz field GSM mobile phone system does not affect long-term potentiation in the dentate gyrus. *Iranian Journal of Radiation Research.*, 5(3), 2007.

[JULIANI, H.R.](#); [WELCH, C.R.](#); [WU, Q.](#); [DIOUF, B.](#); [MALAINY, D.](#) & [SIMON, J.E.](#) Chemistry and quality of *Hibiscus* (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *J Food Sci.*, 74(2):S113-121, 2009.

JUNIOR, M.F.V. & MARTIN, I.M. Medição de radiações não-ionizantes nas cidades de São José dos Campos e Taubaté-SP. Anais do 12º Encontro de Iniciação Científica e Pós-graduação do ITA – XII ENCITA, 2006.

JUNIOR, F. G.G., LIMA, E.R.; LEAL, A.J. F.; MATOS, F.A.; SÁ, M. E. DE & HAG, K. I. Teor de proteína em grãos de feijão em diferentes épocas e doses de cobertura nitrogenada. *Acta Sci. Agron.* Maringá, 27(3):455-459, 2005.
JUNIOR, J.O.C.S. & PEREIRA, N.L. Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shyphytum officinale* L. *Rev. Bras. Farm.*, 90(1): 03-09, 2009.

KAJITA, T. Botanical Gardens, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 3-7-1 Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo 112-001, Japan. (mensagem pessoal). Mensagem recebida por julianabb@pop.com.br em 21 de outubro 2009.

KAO, E. S.; HSU, J. D.; WANG, C. J.; YANG, S.H.; CHENG, S.Y. & LEE, H.J. Polyphenols extracted from *Hibiscus sabdariffa* L. inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation by improving antioxidative conditions and regulating Cyclooxygenase-2 expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(2):385-390, 2009.

KASTURE, V. S.; CHOPDE, C. T. & DESHUMUKH, V.K. Anticonvulsive activity of Albizzia lebbek, Hibiscus rosa-sinensis and Butea monosperma in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 71:65-75, 2000.

Kesari, K.K. & Behari, J. Fifty-gigahertz microwave exposure effect of radiations on rat brain. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 158:126-139, 2009.

KHOLKULE, S.D. Udupa KN. *Indian J Exp Biol.*, 14:175, 1976.

KILIÇALP, D.; DEDE, S.; DEGER, Y. & ASLAN, L. Effects of green tea on mineral levels and testis of Guinea Pigs electromagnetic field emitted by mobile phones. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(2):86-92, 2009.

KOBAYASHI, J. Early Hawaiian uses of medicine plants in pregnancy and childbirth. *Journal of Tropical Pediatrics Environmental Child Health*, 22:260-260, 1976.

KOO, H.M. & SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago, 49(6):3106-3112, 2001.

KRAPOVICKAS, A. Instituto de Botanica del Nordeste, Argentina. (mensagem pessoal). Mensagem recebida por julianabb@pop.com.br em março 2009.

KRISTAL, B. S. & YU, B. P. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J. Gerontology*, 47:B107-B114, 1992.

LAW, R.D. & CRAFTS-BRANDNER, S.J. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology*, 120:173-182, 1999.

LAWTON, B.P. *Hibiscus*. Timber Press, Cambridge, UK (chapter 3), 2004.

LENZ, A.G.; COSTABEL, U.; SHALTIEL, S. & LEVINE, R.L. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal. Biochem.*, 177:419-425, 1989.

LIMA, É. S. & ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37(3):293-303, 2001.

LIN, T.L.; LIN, H.H.; CHEN, C.C.; LIN, M.C.; CHOU, M.C. & WANG, C.J. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutr Res.*, 27: 140-145, 2007.

LIRA, R.S.; DANTAS, I.C.; CAVALCANTI, M. L.F.; BARROS, M. J.B.; LIRA, V.M.DE & CARNEIRO, P.T. Diagnóstico paisagístico do Parque da Criança

em Campina Grande, PB. *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, 4(1), ISSN 1519-5228, 2004.

LIU, J.Y.; CHEN, C.C.; WANG, W.H.; HSU, J.D.; YANG, M.Y. & WANG, C.J. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44:336–343, 2005.

LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; JUNIOR, C. M. J.; MOREIRA, R. R. D. & CARLOS, I.Z. Effect of the essential oil of *Achillea millefolium* L. in the production of hydrogen peroxide and tumor necrosis factor in murine macrophages. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(3), 2005.

MACARTHUR, H.; WESTFALL, T. C. & RILEY, D. P. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc. Natl. Acad. Science*, 97:9753-9758, 2000.

MAGALHÃES, F.H.; OLIVEIRA, P.P. & SANTOS, F. DE A.R. DOS. Morfologia polínica de *Hibiscus pernambucensis* Arruda e *Hibiscus tiliaceus* L. (Malvaceae). *Acta Biologica Leopoldensia*, 26(2):203-211, 2004.

MAGANHA, E.G. Avaliação da atividade biológica *In vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das flores de *Hibiscus tiliaceus* L. Tese, ULBRA, 2009.

[MAGISTRETTI, P.J.](#) & [PELLERIN, L.](#) Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci.*, 14:177-182, 1999.

MARBAN, E.; KORETSUNE, Y. & KUSUOCA, H. Disruption of intracellular Ca⁺² homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischaemia. In: Cellular, Biochemical, and Molecular Aspects of Reperfusion Injury. *Ann. New York Acad. Sci.*, 723:38-58, 1994.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M.; MORALES, A.E. & SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15:75-88, 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M. & TUÑÓN, M.J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 17(6):271-8, 2002.

MAAS, J.L. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries : a review. *Horticult Sci.*, 26:10-13, 1991.

MCCORD, J.M. & DAY, E.D. Superoxide-dependent production of hydroxyl catalyzed by iron-EDTA complex, *FEBS Lett.*, 86:139-142, 1978.

MELECCHI, M.I.S. Características Químicas de Extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo Comparativo de Métodos de Extração. Tese de Doutorado, UFRGS, 2005.

MELECCHI, M.I.S.; PÉRES, V.F.; DARIVA, C.; ZINI, C.A.; ABAD, F.C.; MARTINE Z, M.M. & CARAMÃO, E.B. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13:242-250, 2006.

MELO, E.A. & GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol.SBCTA*. Campinas, 36(1):1-11, 2002.

MERAL, I.; MERT, H.; MERT, N.; DEJER, Y.; YORUK, I.; YETKIN, A. & KESKIN, S. Effects of 900MHz electromagnetic Field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some. *Brain Research*, 1169:120-124, 2007.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P. DE; ARAÚJO, E.L. & AMORIN, E.L.C. DE. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím. Nova*, 28(5), 2005.

MOOSMANN B & BEHL C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert. Opin Investig Drugs*, 10:1407-1435, 2002.

MOUNDIPA, F.P.; NGOUELA, S.; KAMTCHOUING, P.; TSAMO, E.; TCHOUANG UEP, F.M. & CARREAU, S. Effects of extracts from *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* mixture on testosterone production in vitro in adult rat testes slices. *Asian Journal of Andrology*, 8:111-114, ISSN 1008-682X, 2006.

MOHAMADOU, B.A.; MBOFUNG, C.M.F. & THOUVENOT, D. Functional potential of a product from traditional biotechnology: Antioxidant and probiotic potential of mabuja, produced by fermentation of *Hibiscus sabdariffa* seeds in Cameroon. *Journal of Food Technology*, 5(2):164-168, 2007.

MOUJIR, L.; SECA, A.M.L.; SILVA, A.M.S.; LOPES, M.R.; PADILHA, N.; CAVALEIRO, J.A.S. & NETO, C.P. Cytotoxic activity of lignans from *Hibiscus cannabinus*. *Fitoterapia*, 78:385-387, 2007.

MOUSTAFA, Y.M.; MOUSTAFA, R.M.; BELACY, A.; ABOU-EL-ELA, S.H. & ALI, F.M. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *J.Pharma.Biomed.Anal.*, 6:605-608, 2001.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M. & CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 49:1183-1186, 2001.

NAVARRO, M. V. T.; LEITE, J. D. H.; ALEXANDRINO, J. DA C. & COSTACO, E. A. Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro, 15(4):1039-1047, 2008.

NEUBAUER, G.; FEYCHTING, M.; HAMNERIUS, Y.; KHEIFETS, L.; KUSTER, N.; RUIZ, I.; SCHÜZ, J.; ÜBERBACHER, R.; WIART, J. &

RÖÖSLI, M. Feasibility of future epidemiological studies on possible health effects of mobile phone base stations, in: *Bioelectromagnetics*, 28:224-230, 2007.

NORDBERG, J. & ARNÉR, S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med.*, 31:1287-1312, 2001.

CHONDROGIANNI, N. & GONOS, E.S. Proteasome activation as a novel antiaging strategy. *IUBMB Life*, 60(10):651-655, 2008.

OBI, F. O.; OVAT, O. D. & ORIAFO, O. S. J. Time-dependent prevention of carbontetra chloride-induced acute liver damage in the rat by hibiscus rosa-sinensis petal anthocyanidin extract administered in aqueous fifty percent ethanol. *Biokemistri.*, 11:95-104, 2001.

OBOH, G. & ROCHA, J.B.T. Antioxidant and neuroprotective of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*, calyx) and green tea (*Camellia sinensis*) on some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain in vitro. *Food Biophysics*, 2008.

ODIGIE, I.P.; ETTARH, R.R. & ADIGUN, S.A. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverse cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 86:181-185, 2003.

OLIVEIRA, M.A.D. Neurofisiologia do comportamento uma relação entre o funcionamento cerebral e as manifestações comportamentais. Editora ULBRA, 3ª edição, 2005.

OLVERA-GARCÍA, V.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REZENDIZ-LOPEZ, R. I.; REYNOSO-CAMACHO, R.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; ELIZONDO, G. & LOARCA-PIÑA, G. *Hibiscus sabdariffa* L. Extracts Inhibit the Mutagenicity in Microsuspension Assay and the Proliferation of HeLa Cells. *Journal of Food Science*, 73(5):T75-T81, 2008.

ONUJI, J.; TEIXEIRA, P.C.; MEDEIROS, M.H.G. & MASCIO, P.D. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: Possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quím.Nova*, 25(4):594-608, 2002.

ORAL, B.; GUNEY, M.; OZGUNER, F.; KARAHAN, N.; MUNGAN, T.; COMLRKCI, S. & CESUR, G. Endometrial apoptosis induced by a 900 MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. *Adv. Ther.*, 23: 957-973, 2006.

OYELADE, O.J.; ADE-OMOWAYE, B.I.O. & ADEOMI, V.F. Influence of variety on protein, fat contents and some physical characteristics of okra seeds. *Journal of Food Engineering*, 57:111-114, 2003.

PANAGOPOULOS, D.J.; CHAVDOULA, E.D.; NEZIS, I.P. & MARGARITIS, L.H. Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626:69–78, 2007.

PAVICIC, I. & TROSIC, I. In vitro testing of cellular response to ultra high frequency electromagnetic field radiation. *Toxicology in Vitro*, 22:1344–1348, 2008.

PRENESTI, E.; BERTO, S.; DANIELE, P. G. & TOSO, S. Antioxidant Power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*, 100:433-438, 2007.

PHILLIPS, J.L.; SINGH, N.P. & LAI, H. Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology*, 16:79-88, 2009.

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.*, 30:1447-1454, 2000.

QIU, C.; FRATIGLIONI, L.; KARP, A.; WINBLAD, B. & BELLANDER, T. Occupational Exposure to Electromagnetic Fields and Risk of Alzheimer's Disease. *Epidemiology*, 5(6):687-94, 2004.

QUITÉRIO, G.C.M. Produção de artemisinina por *Artemisia annua* L. sob influência de micorriza arbuscular. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. *Dissertação de Mestrado*, 38, 2006.

RAMOS, G. R. Estresse oxidativo e hipometabolismo em gastrópodes *Helix aspersa*. *Dissertação de Mestrado*, UnB, 1999.

RAO, A.V. & BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr. Neuroscience*, 5:291-309, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. Ed. Guanabara Koogan, 6º edição, 502, 2001.

RAUHA, J.P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology, Amsterdam*, 56(1):3-12, 2000.

REDDY, C. M.; MURTHY, D. R. K. & PATIL, S. B. Antiespermatogenic and androgenic activities of various extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* in albino mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35:1170-1174, 1997.

REFSGAARD, H.H.; TSAI, L. & STADTMAN, E.R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 97: 611-616, 2005.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. & MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA,2003.

ROCHA,J.F. & NEVES,L.DE J. Anatomia foliar de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae). *Rodriguésia*, 51:113-132, 2000.

ROCHA,J.F.;NEVES,L.DE J. & PACE,L.B. Estruturas secretoras em folhas de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda. *Revista Universidade Rural*, Série Ciências da Vida, 22(1):43-55, 2002.

RODRIGUES,G. R.; FONSECA,S. M. D.; BONA,S.; PORAWSKI,M. & MARRONI,N. A. P. Efeito da administração do extrato do Croton cajucara Benth em ratos normais. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, (3), 2004.

ROOSLI, M. Radio and microwave frequency radiation and health--an analysis of the literature *Gesundheitswesen*, 6:378-92, 2003.

ROSS,I.A. *Hibiscus rosa-sinensis* in: Medicinal plants of the world chemical constituents, traditional and modern medicinal uses.*Humana Press*,Totowa,New Jercey, 155-163,1999.

ROSA,R.M.; MELECCHI,M.I.S.;HALMENSCHLAGER,R.DA C.; ABAD, F.C.;SIMONI, C.R.; CAMARÃO, E.B.; HENRIQUES, J.A.P.;SAFFI, J. & RAMOS, A.L.L.DE P. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. *J.Agric.Food Chem*, 54:7324-7330,2006.

ROSA,R.M.; MOURA, D.J.;MELECCHI, M.I.S.;SANTOS,R.S. DOS; RICHTER,M.F.; CAMARÃO, E.B.; HENRIQUES, J.A.P.; RAMOS, A.L.L.DE P. & SAFFI, J. Protective effects of *Hibiscus tiliacues* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicology in Vitro*,1-10,2007.

SACHDEWA,A. & KHEMANI,L.D.E. Effect of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. Ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *Journal of Ethopharmacology*, 89:61-66, 2003.

SADAVA,D.;HELLER,H.C.;ORIONS,G.H.;PURVES,W.K.;HILLIS,D.M. Vida: a ciência da biologia.volume 3, 8a edição, editora Artmed,2009.

SALFORD,L. G.; BRUN,A. E.; EBERHARDT,J. L; MALMGREN,L. & PERSSON, B.R. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones.*Environ. Health Perspect*, 111:881-883, 2003.

SALLES, A. A. DE;FERNÁNDEZ C. R. & BONADIMAN, M. Simulações da SAR na cabeça e antenas planares para telefones móveis. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 19(2):77-90, 2003.

SALVADOR, M. & HENRIQUES, J.A.P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Editora da ULBRA, 2004.

SANTOS, N. C. F. Quantificação da ação antioxidante do piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH) contra o estresse oxidativo induzido por íons ferro. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 1998.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J.P.E.; WILLIAMS, R.J.; CADENAS, E. & RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging*, 23:861e 80, 2002.

SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R. DE; PENCHEL, R. M.; ARAÚJO, E.F. DE & FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* 3 *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. *New Forests*, 36:261–271, 2008.

SERRAME, E. & LIM, C.Y.S. Anti-tumour promoting activity of decoctions and expressed juices from Philippine medicinal plants. *Philippine Journal of Science*, 124:275-281, 1995.

SIDDIQUI, A. A.; WANI, S. M.; RAJESH, R. & ALAGARSAMY, V. Phytochemical and pharmacological investigation of *Hibiscus rosasinensis* linn. *Indian J. Pharm Sci*; 68:127, 2006.

SIMKO, M.; HARTWIG, C.; LANTOW, M.; LUPKE, M.; MATTSSON, M.O. & RAHMAN, Q. Hsp 70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells. *Toxicol Lett*, 161:73-82, 2006.

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L. & PETROVICK, P. Farmacognosia da planta ao medicamneto. 2ª Ed. rev. Porto alegre / Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed.universidade/UFSC, 2000.

SINGH, Y.H.; IKAHIHIFO, T.; PANUVE, M. & SLATTER, C. Folk medicine in Tonga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynecological conditions and disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(3):305-329, 1984.

STADMAN, E. R. Protein oxidation and aging. *Science*, 257:1220-1224, 1992.

SOKOLOVIC, D.; DJINDJIC, B.; NIKOLIC, J.; BJELAKOVIC, G.; PAVLOVIC, D.; KOCIC, G.; KRSTIC, D.; CVETKOVIC, T.; CVETKOVIC, T. & PAVLOVIC, V. Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. *Journal of Radiation Research*. 49:579-586, 2008.

SOHAL, R.S. & WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 5:59-63, 1996.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:1715-1733, 1996.

SUBOH, S.M.; BILTON, Y.Y. & ABURJAI, T.A. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research*, (18):280-284, 2004.

TABATAI, M.A. & BREMNER, J.M. A simple turbidimetric method of determining total sulfur in plant materials. *Agronomy Journal*, 62:805-806, 1970.

TAKAYAMA, K.; KAJITA, T.; MURATA, J. & TATEISHI, Y. Phylogeography and genetic structure of *Hibiscus tiliaceus* speciation of a pantropical plant with sea-drifted seeds. *Molecular Ecology*, 15:2871-2881, 2006.

TAKAYAMA, K.; TATEISHI, Y.; MURATA, J. & KAJITA, T. Gene flow and population subdivision in a pantropical plant with sea-drifted seeds *Hibiscus tiliaceus* and its allied species: evidence from microsatellite analyses. *Molecular Ecology*, 17:2730-2742, 2008.

TELEFO, P.B.; MOUNDIPA, P.F. & TCHOUANGUEP, F.M. Inductive effect of the leaf mixture extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis*, *Dicliptera verticillata* and *Hibiscus macranthus* on in vitro production of estradiol. *Journal of Ethnopharmacology*, 91:225-230, 2004.

THOMASSET, S.; TELLER, N.; CAI, H.; MARLO, D.; BERRY, D.P.; STEWARD, W.P. & GESCHER, A.J. Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother Pharmacol.*, 64:2001-211, 2009.

TORRES, B. B. Nutrição e esporte - uma abordagem bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M.A.; VALLE, N.R.D. & HUANG, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8):1343-1374, 2008.

TSENG, T.H. & LEE, YJ. Evaluation of natural and synthetic compounds from East Asiatic folk medicinal plants on the mediation of cancer. *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry*, 6:65-347, 2006.

TYNES, T.H. & HALDORSEN, T. Residential and occupational exposure to 50Hz magnetic fields and hematological cancers in Norway. *Cancer Causes and Control.*, 14:715-720, 2003.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. *Mutat. Res.*, 195:137, 1988.

VAN WIJNGAARDEN, E.; NYLANDER-FRENCH, L.A.; MILLIKAN, R.C.; SAVITZ, D.A. & LOOMIS, D. Population-Based Case-Control Study of Occupational Exposure to Electromagnetic Fields and Breast Cancer. *Ann Epidemiol.*, 11(5):297-303, 2001.

VALKO, M. LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M. & TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39:44–84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DEF.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. DA S. & KUBOTA, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos analíticos para sua Determinação. *Quim. Nova*, 30(5):1323-1338, 2007.

VERSCHAEVE, L. & MAES, A. Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. *Mutat Res.*, 410:141-65, 1998.

VILLENEUVE, P.J.; AGNEW, D.A.; MILLER, A.B. & COREY, P.N. Non-Hodgkin's lymphoma among electric utility workers in Ontario: the evaluation of alternate indices of exposure to 60Hz electric and magnetic fields. *Occup. Environ. Med.*, 57:249-257, 2000a.

WANG, C.J.; WANG, J.M.; LIN, W.L.; CHU, C.Y.; CHOU, F.P. & TSENG, T.H. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against ter-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 38:411-416, 2000.

YANG, B.; KOIANO, A.; ARAI, K. & KUSU, F. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 49:747-751, 2001.

YONG, G.L.; SE, E.B.; JOO, Y.K.; JI, Y.L.; MAN, H.R.; SUNGYOUL, H.; JIN, C.W.; HAN, S.L.; MYONG, J.K.; DONG, H.C. & JAE, Y.C. Immunomodulatory effect of Hibiscus cannabinus extract on macrophage functions. *Journal of Thnopharmacology*, 113:62-71, 2007.

YUDDIM, K. A.; DOBBIE, M.S. & KUHNLE, G. PROTEGGENTE, A.R.; ABBOTT, J.N.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry*, 85:180–192, 2003.

YUREKLI, A.I.; OZKAN, M.; KALKAN, T.; SAYBASILI, H.; TUNCEL, H.; ATUKEREN, P. GUMUSTAS, K. & SEKER, S. GSM base station electromagnetic radiation antioxidative stress in rats, *Electromagn. Biol. Med.*, 25:177–188, 2006.

ZHAO, T.Y.; ZOU, S.P. & KNAPP, P.E. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. *Neuroscience Letters*, 412:34–38, 2007.

ZENI, O.; CHIAVONI, A.S.; SANNINO, A.; FORIGO, D.; BERSANI, F. & SCARFI, M.R. Lack of genotoxic effects (micronucleus induction) in human lymphocytes exposed in vitro to 900MHz electromagnetic fields. *Radiat. Res.*, 160:152-158, 2003.

ZMYSLONY, M.; POLITANSKI, P.; RAJKOWSKA, E.; SZYMCZAK, W. & JAJTE, J. Acute exposure to 930MHz CW electromagnetic radiation *in vitro* affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. *Bioelectromagnetics*, 25:325-328, 2004.

8. APÊNDICE

Effects of chronic exposure to electromagnetic field of Ultra High Frequency 950MHz on the right and left cerebral cortex of rats exposed during pregnancy and lactation

Juliana Becker Borba ^a, Orlando Vieira Furtado Filho ^a, Tatiana Marachin ^b, Larissa Milano Souza ^d, João Antônio Pêgas Henriques ^{a,b}, Jenifer Saffi ^{a,b,c}.

^aDepartment of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^bDepartment of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^cToxicological Genetics Laboratory, Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil

^dStudent of Scientific Initiation, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Abstract

Ultra-high-frequency electromagnetic field (UHF-EMF) is characterized by a frequency of 300 MHz to 3GHz and may cause some damages to health. This study aims to evaluate the effects of electromagnetic waves of ultra-high-frequency on the cerebral cortex of pregnant and lactating rats. The animals were divided into two groups: controls rats (CR) and exposed rats (ER). The rats were exposed thirty minutes per day to an UHF-EMF of 950MHz, electric field of 35 V/m throughout pregnancy and lactating period. The specific absorption rate (SAR) of the exposed group ranged from 0.64 to 0.44 W / kg. These values were calculated for rats ranging from 90 to 132 days of age. The statistical analysis was carried through by means \pm SEM. Values were evaluated by the two-tailed Student's t-Test, being significant the results with $p < 0,05$. Our results showed that the UHF-EMF exposure caused a significant increase of oxidative damage in lipids, proteins and DNA ($p < 0.05$). The results indicate that UHF-EMF of 950MHz cause oxidative stress and is genotoxic to the left cerebral cortex of rats exposed during pregnancy and lactation.

Keywords: Electromagnetic field; UHF EMF; Free radicals; Pregnancy and lactation; Cerebral cortex

INTRODUCTION

Currently, we are exposed to various types of electromagnetic waves. They can be produced by household appliances, power lines and, in recent years by cordless phones and cell phones. Nowadays, the quantity of these phones exceeds the number of 4 billion devices. According to the Brazilian National Telecommunications Agency, the country has already exceeded 152 million sets.

The electromagnetic waves produced by mobile waves are classified as ultra-high-frequency and range from 800 to 2200 MHz (Moulder, 1999). The electromagnetic waves generated by electromagnetic fields are classified as UHF when they range from 300 MHz to 3 GHz (VERSACHAVE AND MAES, 1998).

Ultra-high-frequency electromagnetic field (UHF-EMF) can cause damage to the biological systems (ORAL *et al.*, 2006). One of these biological effects is the formation of reactive oxygen species (ROS) which, in turn, causes damage to macromolecules such as proteins, nucleic acids and lipids (VALKO *et al.*, 2007). The oxidative damage to macromolecules are related to various health problems. Among them are the neurodegenerative Parkinson's and Alzheimer's disease, and other changes in the central nervous system (HALLIWELL AND GUTTERIDGE, 1999). Despite being associated with various diseases the Reactive Oxygen Species (ROS) are important for the destruction of antigens by neutrophils (NEALE *et al.*, 1993). These molecules also participate naturally in cellular signaling as a second messenger (FORMAN *et al.*, 2008).

Pregnancy is marked by a series of changes in the body. One of these changes is hormonal. Some female hormones have neuroprotective function against oxidative stress (DLUZEN, 1997). The brain is the most mysterious and unknown organ in the body. It is responsible for controlling all functions, except the vegetative functions that are controlled by the bulb.

Despite being considered a single structure, the brain is divided into two halves, the left and right cerebral hemispheres. Anatomically, these structures look like the image of one another. Physiologically, the movements and sensations of the body are controlled by opposite sides of the hemispheres.

Due to some characteristics of the human left hemisphere, researchers consider this portion of the brain as dominant (POPPER AND ECLES, 1991). This hemisphere is related to specific activities and objectives, which are related to the rational, logical, practical, realistic, formal and control (SPRINGER AND DEUTSCH, 1993; DE OLIVEIRA, 1999).

The cerebral cortex is the structure of the brain in charge of interpretation and awareness of all pulses from the areas of sensitivity. After interpretation and awareness, the decoding is the preparation of a response by

means of transmission of efferent impulses that command the voluntary movements.

Based on that, one question is raised: what happens to the brain of pregnant and lactating rats exposed to electromagnetic waves of UHF-EMF? There the aim of this study was to evaluate the effects of UHF electromagnetic waves on the cerebral cortex of pregnant and lactating rats.

2. Experimental procedures

2.1 Animals

Twelve female Wistar rats weighing approximately 230g and aged 3 months were used. The animals were divided into two groups: six exposed rats to UHF-EMF and six control rats. They were obtained from the Bioterium of the Biophysics Department of, the Federal University of Rio Grande do Sul. This research was approved by the Ethics Committee of Lutheran University of Brazil. All experiments were performed according to the guide for care and use of laboratory animals of the National Institute of Health (NIH publication No 85-23, revised 1996). Before exposure, the pregnant rats were kept in individual standard boxes (40.5 x 33.3 x 17.5 cm) under a cycle of 12h light/12h dark at a temperature of 23 ± 0.5 ° C with water and balanced diet ad libitum. During exposure to UHF-EMF, the animals were not allowed to drink water and were not fed. The period of exposure was from 12:00 pm to 3:00 pm, for 42 days. The group of control rats – not exposed to EMF – was removed from the boxes and placed inside a Faraday box (without the antenna), at the same time.

2.2 Collection and storage of material

After 42 days of exposure (21 days of gestation and 21 days of lactation) the rats were decapitated with a guillotine. The decapitation occurred in the late afternoon to avoid the antioxidant action of melatonin (*OKTEM et al.*, 2005). The left and right cerebral cortex (LCC and RCC) were removed, immersed in liquid nitrogen and stored at – 80 ° C ultra-freezer.

2.3 Exposure System of UHF EMF

The pregnant and lactating rats were irradiated 30 minutes per day from the day of sperm detection until the weaning of the pups. The boxes of the irradiated groups were placed 11cm apart from the antenna. The antenna and the boxes were always in a cage of Faraday, made of aluminum. The electromagnetic field (EMF) outside the cage measured 0.3 V / m. The cage with the control group was 92cm away from the cage containing the irradiated group. The cages were placed in a wooden tray. The EMF in the control cage measured 0.15 V/m. The electric field generated by the exposure system was 35V/m. A generator of electromagnetic waves – composed of the Aural Broadcast STL generator, model PCL-303 (Moseley PCL-303) and antenna Precision Half-Wave dipole – was used to produce UHF-EMF power of 1W, 950MHz of frequency and antenna for vertical polarization (picture 1). The EMR-30 Radiation Meter (manufacturer by Wandel & Goltermann) was used to measure the intensity of the EMF inside and outside the box.



Picture 1 – Biophysical System

The specific absorption rate (SAR) of the tissue was calculated. The SAR is a measure of energy absorbed by tissue exposed to an electromagnetic. The value was obtained through the formula below, according to ICNIRP (2009). $SAR = (\sigma/\rho \times E)^2 [W/Kg]$, where σ is the electrical conductivity of the sample, E is the average value of electric field and ρ is the density of the sample (brain). In this study, the SAR of the exposed group ranged from 0.64 to 0.44 W / kg. These values were found using 0.54 and 0.37 S/m for conductivity and density of 1040 kg/m³ for tissue. These values were calculated for rats ranging from 90 to 132 days of age, as measured by parameters of *PEYMAN et*

al. (2001). The SAR of the control group ranged from 1.17×10^{-5} to 8.0×10^{-6} W / kg.

2.4 Assays for lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). In this technique, the lipid peroxidation is observed by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with aldehydic compounds, mainly malonaldehyde (MDA), present in tissues, resulting in the formation of an adduct with read absorbance at 532nm (*HERMES-LIMA AND STOREY, 1996, 1998, RAMOS 1999; FURTADO-FILHO, 2007*).

TBARS were quantified as an index of lipid peroxidation exactly as described by *RAMOS AND HERMES-LIMA (2003)* and *FURTADO-FILHO (2007)*, except that frozen samples were homogenized in ice-cold 1.1% phosphoric acid as 1:20 w/v for all tissues. TBARS values were expressed using the extinction coefficient of 156 mM^{-1} . This is an effective assay for determination of TBA-reactive aldehydes, which are mostly products of lipid peroxidation (*HERMES-LIMA, 2004a*).

2.5 Assay of oxidation protein

The oxidized proteins were determined by measuring levels of protein carbonyl (adapted from *LENZ, 1989*). Oxidative damage to proteins was quantified as carbonyl protein using a method employing 2,4-dinitrophenylhydrazine, which reacts with carbonyl groups. This assay was conducted as previously described (*RAMOS-VASCONCELOS AND HERMES-LIMA, 2003; RAMOS-VASCONCELOS et al., 2005; FURTADO-FILHO, 2007*), except that frozen samples were homogenized (1:20 w/v for all tissues) in ice-cold 5% w/v sulfosalicylic acid. Final carbonyl protein values were expressed using the extinction coefficient of 22 mM^{-1} .

2.6 Comet Assay

The comet assay is a technique used to check the damage and effects on DNA repair systems (*SINGH et al.*, 1988). This test detects breaks in DNA, cross-linking, alkali-labile damage and losses resulting from repair by uncompleted excision (*SINGH et al.*, 1988; *TICE et al.*, 2000).

The alkaline comet assay was performed as described by *COLLINS* (2004) with some adaptations by *TICE et al.* (2000). Initially, the weighing of samples of tissue (from 0.0100 to 0.0300 g) was performed with the aid of liquid nitrogen. The samples were allowed to thaw in a styrofoam container with ice and water for 15 min in mincing solution. In an average plate of ELISA in a platform of ice, a solution of 500 μ l (HbSS with 20mM EDTA, 10% DMSO and pH 7,0-7,5) was added. The weighted tissue was added to the mincing solution and perforated with the aid of two tips of 200 μ l in the dark. An amount of 20 μ l of the suspension of cells was collected and dissolved in 0.75% agarose of low melting point (90 μ l). This procedure was also conducted in the darkness.

Immediately, the suspension and agarose were pipetted into a glass sheet, pre-coated with a layer of 1% normal agarose and placed on a stage, which had been previously dried for 15 minutes in a refrigerator. After this period of drying, the stages were removed and placed in vertical cuvette (covered with aluminum foil) and incubated in cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO and pH 10). During the incubation, the slides were protected from light in the refrigerator for one hour to remove the nuclear membranes and cytoplasmic contents, leaving the DNA as nucleoids. After the lysis procedure, the slides were placed in a horizontal electrophoresis tank. This tank was placed inside a plastic tray filled with ice. A solution of (300mM NaOH, 1mM EDTA and pH 13, 0) was added to the electrophoresis buffer to cover the slides, allowing the DNA to relax so that the alkali-labile sites could become more explicit. The electrophoresis was adjusted to a source of 25V and 300mA for 20 minutes (the current was controlled with the volume of the buffer). All previous steps were performed under yellow light or in darkness to prevent additional damage to DNA. The slides were then neutralized within the vertical cuvette (0.4 M Tris and pH 7.5)

for 5min and the procedure was repeated 3 times. Afterwards, the slides were kept in distilled water for 5min. The water was discarded and the procedure was repeated twice. The slides were left to dry overnight. After this period they were hydrated for maintenance in distilled water for 5 minutes. The slides were then stained with silver staining solution, performed according to the protocol described by *NADIN et al* (2001). After staining, the slides dried at room temperature overnight. Finally, they were analyzed using an optical microscope. One hundred cells were selected for each slide, in triplicate. They were visually scored – according to the length of the tail – in five classes: Class 0: non-damaged, without a tail, Class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus), Class 2: with a tail length of 1-2 times the diameter of the head, Class 3: with a tail with more than 2 times the diameter of the head, and Class 4: comets with no heads. The index of damage in each group studied ranged from zero (100x0, 100 cells completely without damage) to 400 (100x4, 100 cells observed with the maximum damage). The frequency of damage (FD) is calculated by subtracting the number of cells without damage (Class 0) from the number of damaged cells (Classes 1,2,3 and 4) and dividing by 100. The values are expressed in percentage.

2.7. Statistical analysis

All data are reported as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by Student's t-test (two tails), with significant results $p < 0,05$.

3. RESULTS

3.1 Lipid Peroxidation

3.1.1 Right Cerebral Cortex

Lipid peroxidation, determined by TBARS, was performed in right cerebral cortex of control rats (CR) and exposed rats (ER) (Table 1). There was no difference between the levels of TBARS between ER and CR.

Table 1 TBARS contents in right cerebral cortex

Animal	Mean	SEM	SD	N
Control	89.1 nmol/g wet wt	8.7	19.4	5
Exposure	72.5 nmol/g wet wt	12.6	30.8	6

No statistical differences (two-tailed t-test) between control rat and exposure rat.

3.1.2 Left cerebral cortex

Lipid peroxidation was performed in the cerebral cortex of control rats (CR) and exposed rats (ER) (Figure 1). Samples of the ER presented higher levels of TBARS (88.3 ± 7.32 nmol/g wet wt) than the CR (64.2 ± 5.20 nmol/g wet wt). TBARS levels in the ER were 1.3-fold higher than in CR.

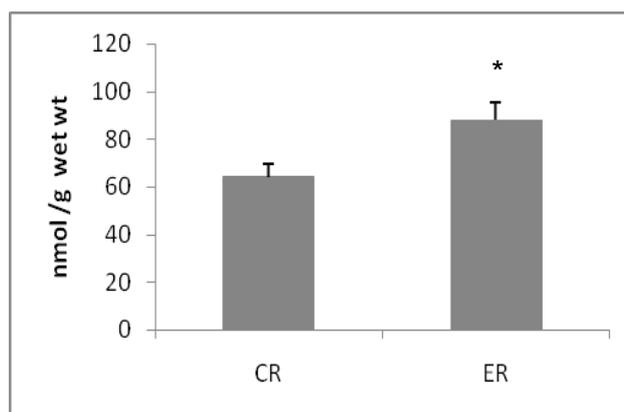


Fig.1 Determination of lipid peroxidation of the left cerebral cortex in rats exposed (ER) and not exposed (CR) to UHF- EMF. The results are presented as mean \pm SEM, n= 6. *: Significantly different from the CR value, $p < 0.05$ (two tailed t-test).

3.2. Carbonyl Protein left cerebral cortex

Protein carbonyl levels of the left cerebral cortex were also higher in the ER (454.5 ± 39.45 nmol/g wet wt) as compared to CR (260.0 ± 60.54 nmol/g wet wt) (Figure 2). The ER presented 1.7 times more protein carbonyl than the CR.

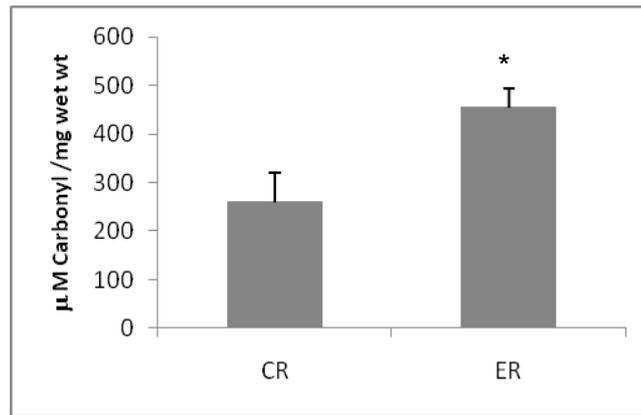


Fig.2 Determination of protein carbonyl in left cerebral cortex in rats exposed (ER) and not exposed (CR) to UHF-EMF. The results are presented as mean \pm SEM, n = 6. *: Significantly different from the CR value, $p < 0.025$ (two tailed t-test).

3.2 Comet left cerebral cortex

The index of damage (ID) was observed by the comet assay. As can be observed in Figure 3, ER presented a significant increase of ID ($275,412 \pm 16,064$ ID) in relation to CR ($184,062 \pm 18,8046$ ID).

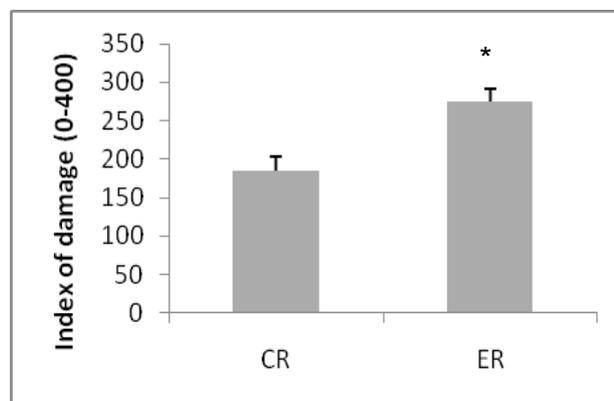


Fig.3 Determination of the comet test the left cerebral cortex in rats exposed (ER) and not exposed (CR) to UHF EMF. The results are presented as mean \pm SEM, n = 16-17. * = $p < 0.001$, T-test (two tailed).

The percentage of total damaged cells was observed by the frequency of damage (FD). There was no difference between ER ($93,4118 \pm 3,925\%$) and CR ($81,8125 \pm 5,055\%$) (Fig 4).

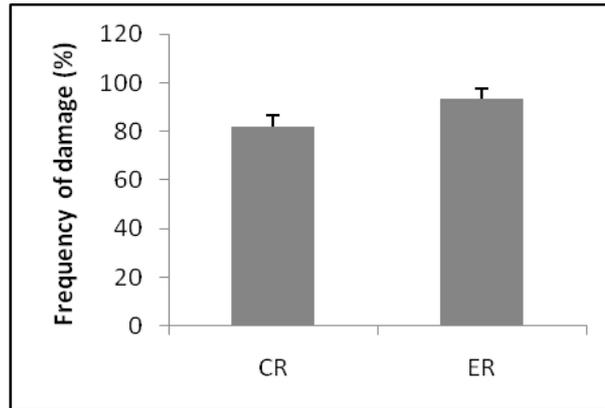


Fig.4 Determination of the frequency of damage by the comet left cerebral cortex in rats exposed (ER) and not exposed (CR) to UHF EMF. The results are presented as mean \pm SEM, n = 16-17. T-test (two tailed). No Significant.

4. DISCUSSION

In recent years, some studies have linked UHF-EMF to neuronal damage (SALFORD,2003), loss of cell in the dentate gyrus (ODACI *et al.*,2008) and development of malignant brain tumors (HARDELL *et al.*, 2006 AND 2007).This study analyzed the effect of UHF electromagnetic waves on the oxidative damage of lipids, proteins and nucleic acids of the cerebral cortex of pregnant and lactating rats. Three months rats were used in the experiment. The animals were exposed during pregnancy and lactation. These rats can be compared to pregnant adolescents exposed to UHF-EMF.

There was no difference in TBARS levels of the right cerebral cortex in either CR and ER (Tabela 1). This can probably be explained by the balance between oxidants and antioxidant defenses. The levels of TBARS in the left cerebral cortex (LCC) of ER were higher than the levels of CR.

The difference found in the left cerebral cortex and absent in the right cerebral cortex could be explained by increased blood flow and high metabolic activity of the left hemisphere (DE OLIVEIRA, 1999). This, combined with the electromagnetic field, might have induced the formation of ROS (MOUSTAFA *et al.*,2001; ORAL *et al.*, 2006; YUREKLI *et al.*, 2006; SIMKO *et al.*, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2009), therefore increasing oxidative stress.

Since the difference in TBARS only happened in the LCC, we decided not to perform the techniques with the RCC.

The levels of oxidized proteins, as measured by protein carbonyl, were higher in exposed rats. The generation of ROS by UHF-EMF may have led to increased oxidative damage in protein (SOKOLOVIC *et al.*, 2008). Moreover, the formation of aldehydes, as in TBARS, may have led to the formation of carbonyl groups (Refsgaard *et al.*, 2005).

The UHF-EMF increased oxidation of DNA in the exposed group (ER) compared to control (CR), as measured by comet assay. ONUKI *et al.* (2002) showed that the ROS and aldehydes - produced during lipid peroxidation - are important agents for the DNA lesion and may lead to mutations that are related to the development of cancer. So the higher levels of oxidative damage in lipids of RE probably produced aldehydic products leading to higher rates of DNA damage. According to PHILLIPS (2009), the RF radiation is genotoxic in the brain of rats exposed, increasing DNA strand break.

The hormonal changes caused by pregnancy and lactation may have made the LCC of the ER more susceptible to the formation of ROS. This increase has been related to decreased levels of estrogen (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000; WASSMANN, 2001).

In conclusion, our results showed that 950 MHz UHF -EMF causes oxidative stress and it is genotoxic to the left cerebral cortex of rats exposed during pregnancy and lactation.

Acknowledgments

CNPq, FAPERGS, FINEP, ULBRA. Jose Claudio Fonseca Moreira and Amâncio Romanelli Ferreira for providing the aluminum Faraday cage. Fernando Sperb Melecchi for lending the signal generator and the vertical polarization antenna. The authors also thank Dr. Temenouga Nikolova Guecheva for the help with the comet assay.

REFERENCES

- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*,26:249-261, 2004.
- DE OLIVEIRA, M.A.D. Neurofisiologia do comportamento, 3ª Edição, Editora ULBRA, Canoas, Br. 1999.
- DLUZEN, D. Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. *Brain Res.*, 767:340–344, 1997.
- FORMAN, H.J.; FUKUTO, J.M.; MILLER, T.; ZHANG, H.; RINNA, A.; LEVY, S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch. Biochem. Biophys.*, 15;477(2):183-95, 2008.
- FURTADO-FILHO, O.V.; POLCHEIRA, C.; MACHADO, D. P.; MOURÃO, G.; HERMES-LIMA, M. Selected oxidative stress markers in a South American crocodilian species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146: 241-254, 2007.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in biology and medicine, 3rd Edition, Clarendon Press, Oxford, UK. 1999.
- HARDELL, L.; CARLBERG, M.; HANSSON MILD, K. Pooled analysis of two case-control studies on use of cellular and cordless telephones and the risk for malignant brain tumours diagnosed in 1997-2003. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 79:630-639, 2006.
- HARDELL, L.; CARLBERG, M.; SÖDERQVIST, F.; MILD, K.H.; MORGAN, L.L. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup. Environ. Med.*, 64:626-632, 2007.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipens*. *Am J. Physiol.*, 271:R545-R553, 1996.
- HERMES-LIMA, M.; RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; CARDOSO, L.A.; ORR, A.L.; RIVERA, P.M.; DREW, K.L. Animal adaptability to oxidative stress: gastropod estivation and mammalian hibernation. In: Barnes, B.M., Carey, H.V. (Eds), *Life in the cold: Evolution, mechanisms, adaptation, and applications – The 11th International Hibernation Symposium (Biological Papers of the University of Alaska, Fairbanks, Alaska, 585-593, 2004.*
- HERNÁNDEZ, I.; DELGADO, J.L.; DÍAZ, J.; QUESADA, T.; JOSÉ, M.; TERUEL, M.; LLANOS, C.; CARBONELL, L. F. 17 beta-Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279:R1599-R1605, 2000.
- ICNIRP GUIDELINES. Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz). 1-372, 2009.

LENZ, A. G.; COSTABEL, U.; SHALTIEL, S.; LEVINE, R. L. Determination of carbonil groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal. Biochem.*, 177: 419-425, 1989.

MOULDER, J.B. Antenas de telefonia celular (Estações Base) e Saúde Humana URL: www.radiacao.com.br/traducao celular.html. 1999.

MOUSTAFA, Y.M.; MOUSTAFA, R.M.; BELACY, A.; ABOU-EL-ELA, S.H.; ALI, F.M. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 26:605-608, 2001.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 49:1183–1186, 2001.

NEALE, T. J.; ULLRICH, R.; OJHA, P.; POCZEWSKI, H.; VERHOEVENT, A. J. AND KERJASCHKI, D. Reactive oxygen species and neutrophil respiratory burst cytochrome b558 are produced by kidney glomerular cells in passive Heymann nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:3645-3649, 1993.

ODACI, E.; BAS, O.; KAPLAN, S. Effect of prenatal exposure to a 900 megahertz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study. *Brain Res.*, 1238:224-229, 2008.

OKTEM, F.; OZGUNER, F.; MOLLAOGLU, H.; KOYU, A.; UZ, E. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone. Protection by melatonin. *Arch. Med. Res.*, 36:350-355, 2005.

ONUJI, J.; TEIXEIRA, P.C.; MEDEIROS, M.H.G. & MASCIO, P.D. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: Possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quím. Nova*, 25(4):594-608, 2002.

ORAL, B., GUNAY, M., OZGUNER, F., KARAHAN, N., MUNGAN, T., COMLRKCI, S., CESUR, G. Endometrial apoptosis induced by a 900 MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. *Adv. Ther.*, 23: 957-973, 2006.

PEYMAN, A., REZAZADEHL, A.A., GABRIEL, C., 2001. Changes in the dielectric properties of rat tissue as a function of age at microwave frequencies. *Physics in Medicine and Biology* 46, 1617–1629.

PHILLIPS, J.L.; SINGH, N.P.; LAI, H. Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology*, 16:79-88, 2009.

POPPER, K.R.; ECLES, J.C.O eu e seu cérebro. Brasília: Universidade de Brasília. 1991.

RAMOS, G. R.. Estresse oxidativo e hipometabolismo em gastrópodes *Helix aspersa*. Dissertação de Mestrado. UnB, 1991.

RAMOS-VASCONCELOS, G.; CARDOSO, L.A. ; HERMES-LIMA, M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Pharmacology and Toxicology, Canadá*,140:165-167, 2005.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; HERMES-LIMA, M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.*, 206: 675–685, 2003.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; CARDOSO, L.A.; HERMES-LIMA, M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 140:165–174, 2005.

REFSGAARD, H.H.; TSAI, L.; STADTMAN, E.R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 97: 611-616, 2005.

SALFORD, L. G.; BRUN, A. E.; EBERHARDT, J. L.; MALMGREN, L.; PERSSON, B. R. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ. Health Perspect.*, 111:881-883, 2003.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175:184–191, 1988.

SIMKO M.; HARTWIG, C.; LANTOW, M.; LUPKE, M.; MATTSSON, M.O.; RAHMAN, Q. Hsp 70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells. *Toxicol Lett.*, 161:73-82, 2006.

Sokolovic, D.; Djindjic, B.; Nikolic, J.; Bjelakovic, G.; Pavlovic, D.; Kocic, G.; KRSTIC, D.; CVETKOVIC, T.; CVETKOVIC, T.; PAVLOVIC, V. Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. *Journal of Radiation Research.*, 49:579-586, 2008.

SPRINGER, S.P.; DUTSCH, G. Cérebro direito, cérebro esquerdo, 3ª edição, Editora Summus, São Paulo, Br, 1996.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:1715-1733, 1996.

TICE, R.R. Single cell gel; comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3):206-221, 2000.

VALKO., M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39:44–84, 2007.

VERSCHAEVE, L.; MAES, A. Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. *Mutat Res.*, 410:141-65, 1998.

WASSMANN, S.; BÄUMER, A. T.; STREHLOW, K.; EICKELS, M. V.; GROHÉ, C.; AHLBORY, K.; RÖSEN, R.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress During Estrogen Deficiency in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation*, 103:435-441, 2001.

YUREKLI, A. I.; OZKAN, M.; KALKAN, T.; SAYBASILI, H.; TUNCEL, H.; ATUKEREN, P.; GUMUSTAS, K.; SEKER, S. GSM base station electromagnetic radiation antioxidative stress in rats. *Electromagn. Biol. Med.*, 25:177–188, 2006.

Juliana Becker Borba

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Juliana Becker Borba
Nascimento 10/08/1977 - Porto Alegre/RS - Brasil
CPF 76443310004

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: O efeito da infusão das flores de *Hibiscus pernambucensis* Arruda sobre ratas gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência.
Orientador: Jenifer Saffi
- 2000 - 2006** Graduação em Biologia- Bacharelado em Biopatologia.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
Título: Relatório de Estágio Curricular em Biopatologia em Imunogenética, Genética Molecular, Hemostasia e Citogenética Clínica.
Orientador: Lavinia Schüler-Faccini
- 2000 - 2007** Graduação em Biologia - Licenciatura Plena.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
Título: Relatório Supervisionado em Ciências Biológicas no Ensino Fundamental e Médio no CMPA.
Orientador: Maria Eloisa Farias Grace Prá e Marise Basso Amaral

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2004 - 2006 Vínculo: Iniciação Científica Cnpq , Enquadramento funcional: Depart de Genética e Biologia Molecular , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

09/2004 - 12/2006 Estágio, Departamento de Genética e Biologia Molecular
Estágio:
Bolsista de Iniciação Científica (Cnpq), pesquisa.

2. Universidade Luterana do Brasil - ULBRA

Atividades

07/2003 - 08/2003 Estágio, Laboratório Toxigen Diagnóstico da Toxicidade e

Mutagênese

Estágio:

Estágio voluntário realizado no Laboratório Toxigen - Diagnóstico da Toxicidade e Mutagênese, pesquisa com Drosófila..

3. Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Vínculo institucional

2006 - 2006	Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Serv de Patologia e Coleta de Exames Laborat , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2006 - 2007	Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Setor de Fertilização Assistida e In Vitro , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2003 - 2005	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Serviço de Genética Médica - Citogenética , Carga horária: 20, Regime: Parcial
1995 - 1996	Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Serviço de Marcação e Coleta de Exames , Carga horária: 20, Regime: Parcial
1994 - 1994	Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Serviço de Recursos Humanos , Carga horária: 20, Regime: Parcial
1994 - 1994	Vínculo: Estágio Voluntário , Enquadramento funcional: Serviço de Recrutamento e Seleção , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

08/2004 - Atual	Estágio, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Serviço de Genética Médica Estágio: Genética Molecular
08/2003 - 07/2004	Estágio, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Serviço de Genética Médica Estágio: Citogenética

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, BANDINELLI, Eliane, BORBA, J. B., FÉLIX, Têmis Maria, ROISENBERG, Israel, FACCINI, Lavínia Schuler
Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. , v.40, p.787 - 791, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BORBA, J. B., Furtado-Filho,O.V., Henriques, Saffi,J.
O efeito da infusão das flores de Hibiscus pernambucensis Arruda sobre ratas gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, 2009, Porto Alegre.

O efeito da infusão das flores de Hibiscus pernambucensis Arruda sobre ratas

gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência. , 2009.

2. Furtado-Filho,O.V., BORBA, J. B., Henriques, Saffi,J.

O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência sobre o fígado e o córtex cerebral de ratos In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, 2009, Porto Alegre.

O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência sobre o fígado e o córtex cerebral de ratos. , 2009.

3. BORBA, J. B., Furtado-Filho,O.V., Maraschin,T., Souza,L.M., Melecchi,F.S., Melecchi,M.I.S., Henriques, Saffi,J.

O efeito da infusão de Hibiscus tiliaceus L. sobre ratas gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência In: X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, 2008, Porto Alegre.

O efeito da infusão de Hibiscus tiliaceus L. sobre ratas gestantes e lactantes expostas ao campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência. , 2008.

4. Furtado-Filho,O.V., BORBA, J. B., Maraschin,T., Souza,L.M., Melecchi,F.S., Moreira, Henriques, Saffi,J.

O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência sobre mitocôndrias e metabolismo de radicais livres em fígado de ratos neonatos In: X Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM, 2008, Porto alegre.

O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-freqüência sobre mitocôndrias e metabolismo de radicais livres em fígado de ratos neonatos_. , 2008.

5. Melecchi,M.I.S., BORBA, J. B., Furtado-Filho,O.V., Melecchi,F.S., Souza,L.M., Maraschin,T., Fanka,B.R., Saffi,J., Caramão,E.B.

Ação Inibidora do Extrato das Flores de Hibiscus tiliaceus L. Sobre Stress Oxidativo Causado por Campo Eletromagnético de Ultra-Alta-Freqüência. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica-ENQA, 2007, João Pessoa-PB.

Anais do 14º Encontro Nacional de Química Analítica-ENQA. , 2007.

6. SANTOS, Pollyanna Almeida Costa dos, HOMRICH, Letícia Becker, BORBA, J. B., BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, FÉLIX, Têmis Maria, Flores,R., FACCINI, Lavínia Schuler
Detoxification Genes and Susceptibility to Labiopalatine Fissures In: 3rd International Conference on Birth Defects Disabilities in the Developing World, 2007, Rio de Janeiro-RJ.

Anais do : 3rd International Conference on Birth Defects Disabilities in the Developing World. , 2007. v.1. p.72 - 72

7. BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, BANDINELLI, Eliane, BORBA, J. B., SANTOS, Pollyanna Almeida Costa dos, ROISENBERG, Israel, FACCINI, Lavínia Schuler

Polimorfismo C677T do gene MTHFR e Síndrome de Down: O papel do ácido fólico. In: Congresso Brasileiro Multiprofissional de Prevenção em Saúde da Criança, 2006, Curitiba-PR.

Anais Congresso Brasileiro Multiprofissional.. , 2006.

8. BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, BANDINELLI, Eliane, BORBA, J. B., FÉLIX, Têmis Maria, ROISENBERG, Israel, FACCINI, Lavínia Schuler

Polimorfismos em genes de Enzimas de Biotransformação e Susceptibilidade a Fissuras Labio-Palatinas. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congresso de La Asociación Latinoamericana de Genética., 2006, Foz do Iguacu-PR.

Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congresso de La Asociación Latinoamericana de Genética.. , 2006.

9. SANTOS, Pollyanna Almeida Costa dos, BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, BANDINELLI, Eliane, FÉLIX, T., BORBA, J. B.

Etiologia dos Defeitos de Fechamento de Tubo Neural: Papel dos Polimorfismos em Genes Relacionados ao Metabolismo do Ácido Fólico. In: XVII Salão de Iniciação Científica., 2005,

Porto Alegre-RS.

Anais do XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS.. , 2005.

10. DUARTE, Letícia Becker Homrich, BORBA, J. B., BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, FÉLIX, T., KVITKO, Kátia, FACCINI, Lavínia Schuler
Genes de Enzimas de Biotransformação e Malformações Congênitas em Humanos: Um Estudo da Interação Genético-Ambiental. In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental., 2005, Natal-RN.

Anais do VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.. , 2005.

11. BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, BANDINELLI, Eliane, BORBA, J. B., FÉLIX, Têmis Maria, ROISENBERG, Israel, FACCINI, Lavínia Schuler

Polimorfismos Relacionados ao Metabolismo da Homocisteína como Fatores de Risco para Fissuras Lábio-Palatinas. In: Congresso Brasileiro de Genética Clínica., 2005, Curitiba.

Anais do Congresso Brasileiro de Genética Clínica.. , 2005.

12. LEITE, F L, MALUF, S., FALLER, M., ROTH,FL, TROMBETTA, G., CHULA, F., ARRUDA,LCF, VASQUES, F., BORBA, J. B., RIEGEL, M

Avaliação de 38 Pacientes com Suspeita de Microdeleção 22q11 (Catch 22). In: V Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre-RS.

Anais do V Salão de Iniciação Científica da PUCRS.. , 2004. p.652 - 652

13. MALUF, S., ROTH,FL, LEITE, F L, TROMBETTA, G., CHULA, F., ARRUDA,LCF, VASQUES, F., BORBA, J. B., RIEGEL, M

Avaliação de 38 Pacientes com Suspeita de Microdeleção 22q11 (catch22). In: 50º Congresso Brasileiro de Genética., 2004, Florianópolis-SC.

Anais do Resumo do 50º Congresso Brasileiro de Genética.. , 2004. p.652 - 652

14. DUARTE, Letícia Becker Homrich, BORBA, J. B., BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, KVITKO, Kátia, FACCINI, Lavínia Schuler

Genes de Enzimas de Biotransformação e Fendas Labio-Palatinas em Humanos: Um Estudo da Interação Genético-Ambiental. In: VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia., 2004, Florianópolis-SC.

Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. , 2004.

15. HOMRICH, Letícia Becker, BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, Carlucci,F.B, KVITKO, Kátia, BORBA, J. B., FACCINI, Lavínia Schuler

Genes de enzimas de biotransformação e Fendas Labiopalatinas em humanos: um estudo da interação genético-ambiental. In: I Workshop de Teratologia e Toxicologia Reprodutiva no Brasil: panorama atual e perspectivas no novo século, 2004, Porto Alegre-Rs.

Anais do I Workshop de Teratologia e Toxicologia Reprodutiva no Brasil.. , 2004.

16. HOMRICH, Letícia Becker, BORBA, J. B., BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, KVITKO, Kátia, FACCINI, Lavínia Schuler

Genes de enzimas de biotransformação e fendas labiopalatinas em humanos: um estudo da interação genético-ambiental. In: Mecanismos de ação tóxica., 2004, Porto Alegre-RS.

Anais do HCPA/ Mecanismos de ação tóxica.. , 2004. p.123 - 123

17. HOMRICH, Letícia Becker, BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro, BORBA, J. B., CARLUCCI,Fernanda Bergmann, KVITKO, Kátia, FACCINI, Lavínia Schuler

Genes de Enzimas de Biotransformação e Malformações Congênitas em Humanos: Um Estudo da Interação Genético-Ambiental. In: Congresso Brasileiro de Genética., 2004, Costão do Santinho.

Anais do Congresso Brasileiro de Genética.. , 2004.

18. TROMBETTA, G., SANSEVERINO, M T V, FALLER, M., CHULA, F., VASQUES, F., BORBA, J. B., DUARTE, H Q G, RIEGEL, M, MALUF, S.

Três Linhagens Citogenéticas Investigadas com a Técnica de FISH em Pacientes SRY Positivo

e Estígmias de Síndrome de Ullrich-Turner. In: V Salão de iniciação Científica., 2004, Porto Alegre-RS.

Anais do V Salão de iniciação Científica da PUCRS. , 2004. p.695 - 695

19. TROMBETTA, G., SANSEVERINO, M T V, FALLER, M., CHULA, F., VASQUES, F., BORBA, J. B., DUARTE, H Q G, RIEGEL, M, MALUF, S.

Três Linhagens Citogenéticas Investigadas com a Técnica de FISH em Pacientes SRY Positivo e Estígmias de Síndrome de Ullrich-Turner. In: 50ºCongresso Brasileiro de Genética., 2004, Florianópolis-SC.

Anais do 50ºCongresso Brasileiro de Genética/Resumos do 50ºCongresso Brasileiro de Genética. , 2004. p.695 - 695

20. FÉLIX, T., FALLER, M., ARRUDA, L. C. F., FRANCESCHI, M., VASQUES, F., CHULA, F., BORBA, J. B., MALUF, S.

Anel do cromossomo 14 em pacientes com retardo no desenvolvimento neuro-psico-motor e crises convulsivas In: X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Genética, 2003, Águas de Lindóia.

Anais do X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Genética. , 2003.

21. ZANDONA, D., FÉLIX, T., TROMBETTA, G., ARRUDA, L. C. F., FRANCESCHI, M., BORBA, J. B., MALUF, S.

Anel do cromossomo 4, monossomia 4 em pacientes com baixa estatura e microcefalia In: X Congresso Brasileiro, 2003, Águas de Lindóia.

Anais do X Congresso Brasileiro de Genética. , 2003.

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. BORBA, J. B., Furtado-Filho, O.V.

Curso Teórico-Prático: Danos Oxidativos e Defesas Antioxidantes, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)