

**17º Congresso de Iniciação Científica****AÇÃO DO EXTRATO DE PIPER REGNELLI SOBRE HEMÓLISE INDUZIDA POR INDUTORES DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA****Autor(es)**

---

CÍNTIA MARIA BERTÁGLIA LUIZETTO

**Orientador(es)**

---

ANA CÉLIA RUGGIERO

**Apoio Financeiro**

---

FAPIC/UNIMEP

**1. Introdução**

---

O estresse oxidativo é uma situação de desequilíbrio entre sistemas protetores e sistemas geradores de espécies reativas que podem atacar o organismo, principalmente lipídios, proteínas e ácidos graxos. (SIES, 1987). Artrite, catarata, Doença de Parkinson, diabetes aloxânica, lesão isquêmica e o próprio processo de envelhecimento são exemplos de desequilíbrio favorável à produção de espécies radicais. (MENENGHINI, 1987),

No organismo, durante o processo de respiração celular pode haver a liberação de espécies ativas de oxigênio (EAO ou EROS), cujo principal produto é o radical hidroxila (MENENGHINI, 1987). Radicais livres ao atacarem o citosol e a membrana eritrocitária, podem gerar radicais peróxil lipídicos (ou lipoperóxidos) agravando todo processo de manutenção da vida eritrocitária e aumentando a destruição da membrana, que acarreta na má seletividade da membrana e conseqüente morte celular (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Por possuir uma alta presença de ácidos graxos poliinsaturados e por ser exposto à uma alta concentração de O<sub>2</sub>, o eritrócito é uma das células mais suscetíveis ao dano oxidativo (CLEMENS et al, 1987)

O sistema de defesa de nosso organismo que equilibra a produção de EROS se dá em dois níveis. Primariamente, ocorre a ação de enzimas como a catalase, o superóxido desmutase e a glutatona peroxidase. As defesas secundárias de nosso organismo surgem a partir de produtos originados na dieta, que impedem a disseminação da reação em cadeia criada pela liberação de radicais hidroxila, originados de peróxidos, geralmente doando um núcleo de hidrogênio para radicais lipídicos. Antioxidantes fenólicos utilizam muito este procedimento (LARSON, 1988).

Os eritrócitos (células vermelhas do sangue) são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo como resultado do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados das suas membranas e da alta concentração celular de oxigênio e hemoglobina (Hb), sendo a Hb um poderoso promotor de processos oxidativos (SATO et al., 1999). Os radicais livres são responsáveis pela peroxidação lipídica e pela oxidação de proteínas que levam à formação de poros hemolíticos que resultam na perda de potássio e seqüencialmente, em hemólise (CAMELO et al. 1994, BUREAU et al. 2005).

A utilização de plantas medicinais vem cada vez ganhando mais destaque no mundo, e especialmente na América Latina, na qual vem contribuindo significativamente com o cuidado primário à saúde. No Brasil, várias plantas utilizadas na medicina popular tem sido alvo de pesquisas e algumas têm demonstrado atividade farmacológica. Entre vários exemplos, poderíamos citar algumas plantas da família Piperaceae, as pariparobas (*Pothomorphe umbellata* L. Miq. e *Piper regnelli*) que são amplamente utilizadas na medicina popular (SCOTT et al., 2005).

Também é conhecido que extratos pertencentes ao gênero *Piper* e *Photomorphe* demonstram reduzir o estresse oxidativo em modelos

de peroxidação lipídica quando testados in vitro. Muitas funções biológicas, inclusive proteção contra mutação genética, carcinogênese e outras são atribuídas aos efeitos antioxidantes (PIETTA, 2000), portanto, devido à alta concentração de antioxidantes presentes no gênero Piper esta espécie foi escolhida.

## 2. Objetivos

---

O objetivo desse projeto foi avaliar o efeito de extrato hidroalcoólico de *Piper regnellii* (pariparoba) no estresse oxidativo induzido em eritrócitos, avaliando especificamente a hemólise oxidativa e a oxidação da hemoglobina.

## 3. Desenvolvimento

---

Os eritrócitos foram isolados do sangue de ratos, lavados três vezes com salina tamponada (PBS, pH 7,4) e ressuspensos em hematócrito de 4%.

Para a determinação da hemólise oxidativa, as suspensões de eritrócitos a 4% foram tratadas com os oxidantes: peróxido de hidrogênio (0,5mM), hidroperóxido de cumeno (0,5mM) e azoiniciador (0,5M). Para o peróxido de hidrogênio, as suspensões foram tratadas com azida sódica, para inibição da catalase.

As suspensões foram incubadas com os oxidantes à temperatura ambiente, com o hidroperóxido de cumeno (CumOOH) e o peróxido de hidrogênio, e a 37°C com o azoiniciador (AAPH), e em intervalos de tempo específicos, alíquotas foram retiradas e ressuspensas em PBS, para avaliação da hemólise e em água destilada, que hemolisa totalmente as células, para avaliação da oxidação da hemoglobina. A seguir os espectros ópticos foram obtidos na região de 400 a 700nm de comprimento. Em seguida as amostras foram tratadas com ferricianeto de potássio a 20% e os espectros determinados novamente.

Para avaliação do efeito do extrato na da hemólise as suspensões de eritrócitos (Ht 4%) foram tratadas inicialmente com o extrato nas concentrações 0,10mg/mL, 0,25mg/mL e 1,0mg/mL (37 °C, 20 min.) e a seguir submetidas a ação dos oxidantes, como já descrito. A porcentagem de hemólise foi calculada considerando-se 100% de hemólise a absorvância da alíquota ressuspensa em água e relacionado-se a absorvância da amostra, ao valor de 100% de hemólise. (SHARMA & SHARMA, 2001).

Cada experimento foi repetido 3 vezes, para que os resultados sejam reproduzíveis na margem de 10% de erro experimental. (LIU et al, 2002).

O efeito do extrato na concentração de metahemoglobina (metaHb) foi analisado através da absorvância das alíquotas tratadas com extrato antes e após a adição do ferricianeto de potássio, que oxida completamente a hemoglobina. O comprimento de onda utilizado aqui foi 630 nm, característico da metaHb. A avaliação da porcentagem de metaHb foi realizada para as suspensões ressuspensas em água destilada.

A porcentagem de hemoglobina oxidada, nas suspensões de eritrócitos, foi determinada espectrofotometricamente usando os coeficientes de extinção molar das diferentes espécies de hemoglobina (oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicromos) no pH 7,4 (WINTERBOURN, 1990). A partir dos valores das absorvâncias ou densidade ótica nos comprimentos de onda 560, 577, 630 e 700nm as concentrações (mmol/L) das diferentes espécies de hemoglobina foram calculadas, utilizando as equações:

A avaliação das quantidades relativas das espécies oxidadas de hemoglobina foi realizada para os eritrócitos ressuspensos em água destilada. A porcentagem de cada espécie foi determinada em relação ao total de Hb.

Todos os valores foram determinado como a média +/- desvio padrão. Os valores obtidos que estiveram fora do desvio de 10% da média foram desconsiderados. Todos os experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes com amostras diferentes. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste t de Student para os dados não pareados e para a análise de variância foi utilizado o teste ANOVA. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultado e Discussão

---

O efeito do extrato sobre os eritrócitos não causou hemólise significativa. Os valores obtidos em todos os tempos de incubação e para as três concentrações de extrato utilizadas se mantiveram menores do que 10%, comparáveis aos controles, sem extrato.

Na análise do efeito do extrato sobre a hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio os resultados obtidos são relativos à hemólise total, alíquotas ressuspensas em água destilada. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz a hemólise significativa, a partir dos 30 minutos de incubação e essa hemólise, após 60 minutos de incubação, aproxima-se da hemólise total. O extrato hidroalcoólico de pariparoba não apresentou efeito contra a hemólise induzida pelo oxidante; para todas as concentrações testadas, as porcentagens de hemólise ficaram muito próximas do controle, indicando que o extrato não foi capaz de proteger as células do ataque oxidativo do peróxido de hidrogênio, levando as células à ruptura, hemólise.

O efeito do extrato sobre a oxidação da hemoglobina à metahemoglobina (FeII a FeIII) foi avaliado com o objetivo de se avaliar a

capacidade do extrato em proteger a hemeproteína do dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. O extrato não exerceu proteção efetiva, não protegeu os eritrócitos da produção de metahemoglobina. Na oxidação da hemoglobina induzida por oxidantes várias espécies oxidadas podem ser formadas, a partir da oxiHb, além da metaHb, entre elas a ferrilhemoglobina (heme-Fe IV) e os hemicromos, além de espécies intermediárias difíceis de serem determinadas (JIA & AKAYASH, 2008). Dessa forma, avaliou-se a decomposição da oxiHb e o efeito do extrato sobre esse decaimento. O extrato apresentou efeito, concentrações menores de 0,10 e 0,25 mg/mL, na proteção à oxiHb e sua transformação em espécies oxidadas.

O efeito do extrato sobre o estresse induzido por cumOOH, é um indutor lipofílico, ele preferencialmente se liga à membrana e essa regula a liberação das moléculas do oxidante, não sendo a hemeproteína o alvo inicial do ataque dos radicais formados pelo cumOOH (VAN DEN BERG et al., 1992). O extrato de pariparoba apresentou um pequeno efeito protetor, na concentração de 0,25 mg/mL, quanto a hemólise induzida pelo cumOOH. O extrato não protegeu os eritrócitos da oxidação da hemoglobina, para todas as concentrações de extrato a porcentagem de metaHb formada foi semelhante à do controle, onde as suspensões foram tratadas apenas com o oxidante. Não se observou efeito do extrato na transformação da oxiHb induzida pelo cumOOH, o decaimento da concentração de oxiHb foi semelhante ao controle.

O indutor AAPH (azoniciador) se decompõe a 37°C em solução aquosa e gera radicais alquila que na presença do oxigênio são convertidos no radical peroxila correspondente. Esses radicais peroxila induzem a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas dos eritrócitos levando a peroxidação lipídica (BANERJEE et al., 2008). O extrato hidroalcoólico de folhas de Piper regnelli apresentou efeito protetor significativo contra a hemólise induzida pelo azoiniciador, nos tempos de incubação mais altos, 90 a 180 min, os valores obtidos são significativamente diferentes em relação ao controle ( $p < 0.05$ ). O extrato também apresentou efeito significativo em relação à oxidação da hemoglobina, há uma diminuição significativa da concentração de oxiHb no controle, ausência do extrato, que é quase totalmente decomposta no tempo de 180 min. Na presença do extrato, quantidades significativas de oxiHb estão presentes: 14%, para concentração de 0,10 mg/mL, cerca de 38% para 0,25 mg/mL e cerca de 85%, na concentração mais alta 1,0 mg/mL.

## 5. Considerações Finais

---

Os resultados obtidos nesse projeto demonstraram que o extrato hidroalcoólico de folhas de Piper regnelli pode inibir a hemólise oxidativa induzida pelo azoiniciador hidrofílico AAPH e a oxidação da hemoglobina induzida por ele, diminuindo a produção de metahemoglobina e inibindo a decomposição da oxihemoglobina. Além desse efeito significativo no estresse oxidativo induzido pelo azoiniciador, observou-se também efeito protetor contra a decomposição da oxihemoglobina dos eritrócitos submetidos à ação do peróxido de hidrogênio, também um indutor hidrofílico. Por outro, quando se utilizou o indutor lipofílico, o hidroperóxido de cumeno, o extrato não foi capaz de proteger os eritrócitos do dano oxidativo, não exerceu efeito protetor contra a hemólise induzida, nem contra a oxidação da hemoglobina. Esses resultados podem indicar que, os componentes presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de pariparoba, têm características hidrofílicas e podem proteger o dano oxidativo induzido nesse ambiente celular, não conseguindo, devido às suas características de solubilidade, proteger os ambientes celulares hidrofóbicos, onde o hidroperóxido de cumeno inicia o ataque aos lipídios.

## Referências Bibliográficas

---

- ABDALLA D. S. P.; LIMA E. S. Peroxidação lipídica: mecanismos de avaliação em amostras biológicas. **Braz. J. Pharm. Sci.** 37 (3), 23-30, 2001. Disponível em: <http://www.rbcbf.usp.br/Edicoes/Volumes/V37N3/PDF/v37n3p293-303.pdf>. Acesso em: 27/01/2009.
- BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity or curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chem. Biol. Interact.** 174:134-139, 2008.
- BUREAU, A.; LAHET, J.-J.; LENFANT, F.; BOUYER, F.; PETITJEAN, M.; CHAILLOT, B.; FREYSZ, M. Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. **Biomed. Pharm.** 59: 341-344.
- CARAMELO, C.; RIESCO, A.; OUTEIRINO, J.; MILLAS, I.; BLUM, G.; MONZU, B. Effects of nitric oxide on red blood cells: changes in erythrocytes resistance to hypotonic hemolysis and potassium efflux by experimental maneuvers that decrease nitric oxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 199:447-454, 1994.
- CLEMENS, M. R.; WALLER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chem. Phys. Lipids**, 251-268, 1987.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 43(1), 61-68, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n1/2075.pdf>. Acesso em: 27/01/2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University. 1999.
- JIA, Y.; ALAYASH, A. Effects of (-)-epigallocatechin gallate on the redox reactions of human hemoglobin. **Free Radic. Biol. Med.** 45:659-666, 2008.
- JOHNSON, R.; GOYETTE, G. J.; RAVINDRANTH, Y.; HO, Y. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. **Free Radic. Biol. Med.** 39: 1407-1417, 2005.
- LARSON, R. The antioxidants of higher plants. **Phytochem.** 27: 969-978, 1988.

LIU, Z.; HAN, K.; LIN, Y.; LUO, X. Antioxidative or prooxidative effect of 4-hydroxyquinoline derivatives on free-radical-initiated hemolysis of erythrocytes is due to its distributive status. **Biochim. Biophys. Acta.** 1570, 97-103, 2002.

MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, 28, 57-62, . 1989.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, 63:1035-1042, 2000.

PÓVOA H. **Radicais Livres em Patologia Humana**. 1 ed. Rio de Janeiro: Imago. 1995.

SATO, Y.; SATO, K.; SUZUKI, Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: II. Comparison of calculated rate constants from hemolysis with experimental constant. **Arch. Biochem. Biophys**, 366:61-69, 1999.

SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; JENSEN, H.; LIVESEY, J. F.; POVEDA, L.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; DURST, T.; ARNASON, J. T. Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. **J. Agric. Food Chem.** 53, 1907-1913, 2005.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharm.** 74, 239-243, 2001.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem. Int. Engl.** 25:1058-1071, 1986.

VAN DEN BERG, J.J.M; OP DEN KAMP, J.A.F.; LUBIN, B.H.; ROELOFSEN, B. KUYPERS, F.A. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. **Free Radic. Biol. Med.** 12: 487-498, 1992.

YOUNGSON, R. **Como Combater os Radicais livres**. 1ªed. Rio de Janeiro: Editora campus. 1995.

WINTERBOURN, C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods Enzymol.** 186, 265-272, 1990.