



18º Congresso de Iniciação Científica

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO ACETATO DE PIPER REGNELLII NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDO EM ERITRÓCITOS**

Autor(es)

THIAGO HENRIQUE BARNABE CORREA

Orientador(es)

ANA CÉLIA RUGGIERO

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

A atividade de espécies químicas reativas aos componentes biológicos tem sido alvo de intensa investigação científica nos últimos anos (HALLIWELL, 2000). A geração dessas espécies, chamadas de radicais livres (RL), é essencial a certos mecanismos fisiológicos que desempenham funções vitais ao organismo, tais como a defesa imunitária e a produção de eicosanóides (BARBER & HARRIS, 1994). No entanto, a alta reatividade dos radicais livres também está relacionada ao desenvolvimento de certas patologias, como: câncer, doenças hepáticas e envelhecimento (CHISOLM & STEINBERG, 2000).

A instabilidade eletrônica dos radicais livres possibilita uma alta reatividade a diversas estruturas biológicas, o que promove distintas lesões ao organismo, inclusive em biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Este último é oxidado quando se encontra na forma de ácidos graxos poliinsaturados, num fenômeno denominado peroxidação lipídica (LIMA & ABDALLA, 2001). Na tentativa de combater ou inibir a ação dos RL, nosso organismo possui mecanismos de defesa contra essas espécies químicas altamente reativas, os chamados antioxidantes (MARTYN, 1998).

O nosso organismo possui sistemas de defesa antioxidante muito eficiente contra as EROS. Um desses sistemas antioxidantes são as enzimas endógenas. As principais são a superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona-peroxidase (GSH-Px), glutatona reduzida (GSH) e glutatona-redutase (GSH-Rd) (PÓVOA, 1995).

Em eritrócitos (células vermelhas do sangue), o estresse oxidativo induzido altera a estrutura da membrana celular e os RL são responsáveis pela peroxidação lipídica da membrana, além da oxidação de proteínas que leva à formação de poros hemolíticos. Tal agressão resulta em um vazamento de potássio no meio extracelular e, conseqüentemente, a hemólise (BUREAU, 2005).

Os eritrócitos são bem equipados com diversos mecanismos biológicos de defesa contra o estresse oxidativo (SCHIAR et al. 2009) constituído por uma série de compostos antioxidantes que são capazes de prevenir a maioria dos efeitos adversos do estresse oxidativo, principalmente as enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona, glutatona redutase e glutatona peroxidase além de um sistema proteolítico que pode hidrolisar proteínas que sofreram oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MURAKAMI & MAWATARI, 2003).

A utilização de fitoquímicos em terapias como a naturopatia (medicina natural) vem se tornando cada vez mais comum, e especialmente na América Latina, várias plantas utilizadas na medicina popular tem sido alvo de intensa pesquisa, na qual, grande variedade tem demonstrado atividade farmacológica. Entre vários exemplos, poderíamos citar algumas plantas da família Piperaceae - (*Pothomorphe umbellata* L. Miq. e *Piper regnellii*) que são amplamente utilizadas no tratamento de diversas doenças (SCOTT et al., 2005).

Investigações fitoquímicas feitas com as espécies *Piper* revelaram várias classes de produtos naturais com atividade fisiológica como alcalóides, amidas, pironas, desidrocalconas, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, flavonas e flavanonas (ZHANG et al. 1995, BENEVIDES et al. 1999), portanto, devido à alta concentração de antioxidantes presentes no gênero *Piper* esta espécie foi escolhida.

2. Objetivos

O objetivo deste projeto foi avaliar a capacidade antioxidante do extrato acetato de folhas de *Piper regnellii* (pariparoba) em proteger eritrócitos contra o estresse oxidativo induzido.

3. Desenvolvimento

Os eritrócitos de ratos foram coletados em heparina, lavados três vezes com salina tamponada, PBS (pH 7,4) e ressuspensos também em PBS na concentração final de 4% de hematócrito (4 mL de eritrócitos em 100 mL volume final).

Para a determinação da hemólise oxidativa, as suspensões de eritrócitos a 4% foram tratadas com os oxidantes: hidroperóxido de cumeno (0,5mM) e azoiniciador (0,5M).

As suspensões foram incubadas com os oxidantes à temperatura ambiente, com o hidroperóxido de cumeno (CumOOH), e com o azoiniciador (AAPH) à 37°C, e em intervalos de tempo específicos, alíquotas foram retiradas e ressuspensas em PBS, para avaliação da hemólise e em água destilada, que promove a hemólise total das 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 0,25mg.mL⁻¹ e 1,0mg.mL⁻¹ (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 absorbância da alíquota ressuspensa em água e relacionado-se a absorbância 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 absorbância das alíquotas tratadas com extrato antes e após a adição do ferricianeto de potássio. 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 partir dos valores das absorbâncias ou densidade ótica nos comprimentos de onda 560, 577, 630 e 700nm as concentrações (mmol/L) das diferentes espécies de hemoglobina foram calculadas.

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 determinados com 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.

4. Resultado e Discussão

Pode-se observar que o extrato por si não induz à hemólise quando se compara com o controle e com o 100% de hemólise - suspensão ressuspensa em água destilada. E, avaliando a ação do extrato foi possível notar que o mesmo não causa oxidação da hemoglobina.

O hidroperóxido de cumeno (cumOOH) é um indutor lipofílico, e preferencialmente se liga à membrana e essa regula a liberação das moléculas do oxidante, não sendo a hemeprteína o alvo inicial do ataque dos radicais formados pelo hidroperóxido de cumeno (VAN DEN BERG et al., 1992).

O extrato acetato de folhas de pariparoba apresentou um pequeno efeito protetor, na concentração de 0,25 mg.mL⁻¹ e significado efeito na concentração 1,00 mg.mL⁻¹, como pode ser observado na figura 1. Apresentou também nesta última concentração efeito protetor nos eritrócitos da oxidação da hemoglobina quando a hemólise foi induzida pelo cumOOH.

A quantidade relativa de oxiHb na concentração do extrato em 1,00 mg.mL⁻¹, foi maior que no controle oxidativo e na concentração de 0,25 mg.mL⁻¹. No tempo de incubação de 180 minutos, observou-se cerca de 63% oxiHb na suspensão tratada com o extrato, na concentração de 1,00 de mg.mL⁻¹ enquanto o controle oxidativo (COX) apresentou cerca de 57% da proteína não oxidada, o que indica um efeito do extrato, na concentração 1,00 mg.mL⁻¹ em proteger a oxidação da proteína.

O azoiniciador é utilizado como oxidante, ele se decompõe a 37°C em solução aquosa para gerar radicais alquila (R?) que na presença

do oxigênio é convertido no radical peroxila correspondente (R'OO?). 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 acetato de folhas de *Piper regnelli* apresentou efeito protetor significativo contra a hemólise induzida pelo azoiniciador. Nos tempos de incubação mais altos, 120 a 180 min, da concentração 1,00 mg.mL⁻¹, os valores obtidos foram significativamente diferentes em relação ao controle (p <0.05) indicando o efeito protetor do extrato sobre a hemólise induzida pelo azoiniciador.

Uma significativa diminuição da porcentagem de hemólise foi observada para a concentração 1,00 mg.mL⁻¹. Com relação à oxidação da hemoglobina os resultados indicaram que o extrato acetato de folha também apresenta efeito protetor contra a oxidação. Pode-se observar o efeito protetor do extrato em relação à porcentagem de metaHb produzida, principalmente na concentração 1,00 mg. mL⁻¹. A porcentagem de metaHb produzida foi menor na presença do extrato em relação ao controle e a quantidade relativa de oxiHb apresentou efeito nas concentrações do extrato em 0,25mg.mL⁻¹ e 1,00 mg.mL⁻¹, como pode ser visto na figura 2. No tempo de incubação de 180 minutos, observou-se cerca de 82% de oxiHb na suspensão tratada com o extrato, na concentração de 1,00 de mg.mL⁻¹ e 45% na concentração 0,25 mg.ml⁻¹, enquanto o COX apresentou cerca de 31% da proteína não oxidada, evidenciando um efeito do extrato em proteger a oxidação da proteína.

5. Considerações Finais

Os resultados obtidos nesse projeto evidenciaram que o extrato acetato de folhas de *Piper regnelli* pode inibir a hemólise oxidativa induzida pelo azoiniciador hidrofílico AAPH e a oxidação da hemoglobina induzida pelo mesmo, 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 hemólise dos eritrócitos submetidos à ação do hidroperóxido de cumeno, um indutor lipofílico. A redução na produção de metahemoglobina e a inibição da decomposição da oxihemoglobina foram observadas, no entanto, em menor proporção.

Esses resultados podem indicar que, os componentes presentes no extrato acetato das folhas de pariparoba, têm características hidrofílicas e lipofílicas, e podem proteger a célula do dano oxidativo induzido, além de proteger os ambientes celulares hidrofóbicos, onde o hidroperóxido de cumeno inicia o ataque aos lipídios. Mas o efeito mais significativo observado para o azoiniciador hidrofílico se deve provavelmente a uma proporção maior de compostos hidrofílicos, capazes de proteger a hemoglobina previamente, antes que essa, ao ser oxidada amplie os efeitos oxidantes.

Referências Bibliográficas

- BARBER, A. D., HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and oxidants: a review amer. **Amer: Pharm.**, v.34, n.9, p.26-35, 1994.
- 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.
- BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P. & KATO, M. J. phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli* . **Phytochem.** 52:339-343, 1999.
- BUREAU, A. Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** p. 341-344, 2005.
- CHISOLM, G. M., STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis : a overview. **Free Radical Biol. Med.**, v.28, n.12, p.1815-1826, 2000.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovas. Res.**, v.47, p.410-418, 2000.
- HALLIWELL, B & GUTTERIDGE. Free radicals in biology and medicine. New York: **Oxford University.** 1999.
- LIU, Z.; HAN, K.; LIN, Y.; LUO, X. Antioxidative or prooxidative effect of 4-hydroxyquinoline derivatives on free-radical-initiated hemolysis or erythrocytes is due to its distributive status. **Biochim. Biophys. Acta.** 1570, 97-103, 2002.
- LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação de amostras biológicas. **Revista Brasileira de**

MURAKAMI, K. & MAWATARI, S. Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of γ -hemoglobin to membrane. **Arch. Biochem. Biophys.** 417, 244-250, 2003.

PÓVOA, H. Radicais Livres em Patologia Humana. Rio de Janeiro: Imago Ed., 416 p., 1995.

SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; JENSEN, H.; LIVESEY, J. F.; POVEDA, L.; SANCHEZ-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.

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.

ZHANG, L.; WU, F. & McLAUGHLIN, J. L. Annohexocin, a novel mono-THF acetogenin with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). **Bioorg. Med. Ch.**

Anexos



