

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS NO ERITRÓCITO E ATIVIDADE  
FOTOPROTETORA DE EXTRATOS VEGETAIS

Bolsista: Thaires Suelen Silva Lino, CNPq

MANAUS  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0024/2008

MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS NO ERITRÓCITO E ATIVIDADE  
FOTOPROTETORA DE EXTRATOS VEGETAIS

Bolsista: Thaires Suelen Silva Lino, CNPq  
Orientador: Profº Drº Emerson Silva Lima

MANAUS

2009

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	4
RESUMO.....	5
1.INTRODUÇÃO .....	6
2.OBJETIVOS.....	8
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
3.1 Danos à pele na exposição excessiva solar .....	9
3.2 Estresse oxidativo.....	11
3.3 Biomarcadores.....	12
3.4 Sistemas Antioxidante do Eritrócito.....	15
3.5 Defesas de antioxidantes presentes em plantas na pele .....	16
3.6 Uso de substâncias antioxidante.....	17
4.MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 Matéria prima vegetal.....	20
4.2 Eritrócitos .....	20
4.3 Modificações oxidativas do eritrócito mediada por radiação UV .....	20
4.4 Marcadores da oxidação no eritrócito .....	21
5.RESULTADOS .....	23
6.CONCLUSÃO .....	29
7.REFERÊNCIA .....	30

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

FIGURA 1: Radiação nas camadas da pele.....	10
FIGURA 2: Mecanismo de lesão e proteção eritrocitária.....	15
FIGURA 3: Esfregaço.....	23
TABELA 1: Índices hematimétricos – Método Químico.....	24
TABELA 2: Índices hematimétricos – Método Radiação Direta.....	25
TABELA 3: Absorbância de hemólise.....	26
TABELA 4: Concentração de Malondialdeido – Método Radiação Direta.....	27
TABELA 5: Concentração de Malondialdeido – Método Químico.....	27
TABELA 6: Absorbância de carbonila.....	29

## RESUMO

Devido aos efeitos nocivos dos radicais livres no organismo humano, muitas pesquisas hoje buscam novos agentes antioxidantes assim como novas metodologias e biomarcadores com relação bem estabelecida entre a concentração do biomarcador e a exposição ao agente, ao dano induzido ou à susceptibilidade pesquisada. Atualmente eritrócitos têm sido usados como modelo para investigar danos oxidativos em biomembranas por causa de sua alta vulnerabilidade para peroxidação. Este trabalho teve como objetivo identificar biomarcadores de modificações oxidativas mediadas por radiação ultravioleta no eritrócito, visando a elaboração de um método para estudo da atividade fotoprotetora de extratos vegetais. Foram utilizados como marcadores da oxidação dos eritrócitos a medida da forma e do volume, a monitoração da oxidação de proteínas, através da dosagem de carbonilas; a detecção de alterações na oxidação de lipídeos, pela dosagem de malondialdeído e a capacidade hemolizantes da célula sob exposição a radiação UV. Os biomarcadores utilizados nesse estudo mostraram-se ao final não ser eficientes em monitorar a oxidação mediada por radiação UV. As alterações medidas foram relativamente baixas ou inexistentes nas doses de radiação empregadas, inviabilizando o uso do método proposto para o estudo de extratos vegetais como protetores da radiação UV em eritrócitos.

**Palavras Chaves:** Eritrócito, oxidação, fotoproteção, radiação UV

## 1. INTRODUÇÃO

Os eritrócitos são células únicas que executam funções vitais ao organismo. Quando maduros, nos mamíferos, são células anucleadas que normalmente circulam por alguns meses apesar de sua limitada capacidade sintética e do fato de se expor repetidas vezes a insultos mecânicos e metabólicos. O fato de não possuírem núcleo e outras organelas impossibilita a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. Possuem diversas funções biológicas, incluindo as funções de transporte de oxigênio, dióxido de carbono e o tamponamento dos íons de hidrogênio que estão interligadas. (HARVEY et. al., 2003). A membrana dos eritrócitos é composta por dupla camada lipoprotéica que é responsável pela formação da superfície da célula. Sustentando esta estrutura participam várias proteínas: anquirina, espectrina alfa e beta, banda 4.1, banda 3, actina e tropomiosina, além do colesterol. Essas proteínas se interagem nos sentidos horizontais e verticais, dando plasticidade à célula. O colesterol participa na estrutura lipo-protéica interagindo entre as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas da célula, protegendo os ácidos graxos contra a ação de radicais livres. (BENNETT, 1981).

A radiação UV faz parte da luz solar que atinge a Terra. Ao atingir nossa pele, os raios UV penetram profundamente e desencadeiam reações imediatas como as queimaduras solares, as fotoalergias (alergias desencadeadas pela luz solar) e o bronzeamento. Provocam também reações tardias, devido ao efeito acumulativo da radiação durante a vida, causando o envelhecimento cutâneo e as alterações celulares que, através de mutações genéticas, predispõem ao câncer da pele. Um dos problemas mais graves que tem sido foco de estudos é a exposição a esses raios ultravioletas que provocam alterações que aceleram o envelhecimento através de efeitos oxidantes com a

formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) podendo estar relacionados a alguns tipos de câncer (AFAQ et. al., 2005).

As radiações UVA e UVB são responsáveis pela diminuição de sistemas antioxidantes cutâneos e responsáveis pelo aumento de sistemas oxidantes. (CASAGRANDE et.al., 2006). Sabe-se que a radiação solar está com maior intensidade na superfície da Terra e os estudos de fotosensibilização têm sido cada vez mais comuns, como os testes com drogas como a fluoroquinolona e seus derivados usados em animais, potentes fotosensibilizadores. A fluoroquinolona induz o eritema devido sua afinidade com a melanina, esses eritemas são tratados com inibidores de ciclooxigenases, inibidores de H1 e H2, inibidor de óxido nítrico sintetase e  $\beta$ -caroteno, em cada droga há uma resposta orgânica diferente sugerindo a diferença de ação dos raios UVA e UVB. (AKTER et.al., 1998).

Com a falta de equilíbrio das ERO um estado pró-oxidativo é formado e depois o estresse oxidativo (GUARATINI, 2007). Há alteração ainda no DNA das células expostas a essas reações. É necessário analisar o tempo de exposição ao agente oxidante, à dose de UV e o tipo de comprimento de onda para avaliar as transformações que a pele sofre.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Identificar biomarcadores de modificações oxidativas mediadas por radiação ultravioleta no eritrócito, visando a elaboração de um método para estudo da atividade fotoprotetora de extratos vegetais.

### **2.2 Específicos:**

2.2.1 Estudar modificações na forma e conteúdo dos eritrócitos submetidos à radiação UV

2.2.2 Monitorar a oxidação de proteínas em eritrócitos expostos à radiação UV

2.2.3 Detectar alterações na oxidação de lipídeos nos eritrócitos após radiação UV

2.2.4 Utilizar os principais marcadores do processo de oxidação na elaboração de um método para estudo de extrato de plantas com atividade fotoprotetora.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Danos à pele na exposição excessiva solar**

A pele é o maior órgão do corpo humano. É dividida em duas camadas: uma externa, a epiderme, e outra interna, a derme. A pele protege o corpo contra o calor, a luz e as infecções. Ela é também responsável pela regulação da temperatura do corpo, bem como pela reserva de água, vitamina D e gordura (OKUNO & VILELA, 2005).

Uma função importante da epiderme é promover uma barreira protetora contra as agressões do ambiente, incluindo a radiação UV (HILDESHEIM, 2004).

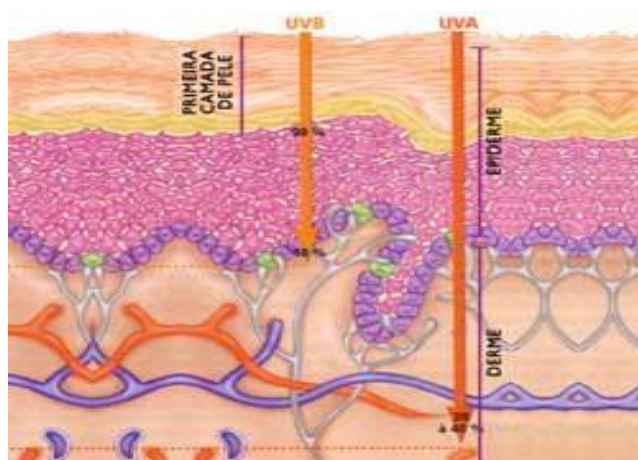
A ação dos raios UV sobre a pele é um processo complexo que está associado com reações químicas e morfológicas. As alterações na epiderme envolvem espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermo-epidérmica. Os queratinócitos começam a demonstrar resistência à apoptose e podem sobreviver por um tempo maior, possibilitando dessa maneira o acúmulo de alterações no DNA e alterações em proteínas, o que facilita o processo da carcinogênese (WULF et. al., 2004). O espectro eletromagnético solar pode ser subdividido em três regiões: UV-A 320- 400nm, UV-B 290-320nm e UV-C 200-290nm (QUINN, 1997).

A radiação UV-A, que corresponde a mais de 90% da radiação solar (QUINN, 1997), tem o maior comprimento de onda e uma baixa quantidade de energia UV, e provoca pigmentação próxima à superfície da pele, tendo como principais efeitos o ressecamento e o envelhecimento precoce. A radiação UV-B tem um comprimento de onda menor e uma quantidade de energia maior que a radiação UV-A, causando pigmentação profunda, ressecamento, envelhecimento precoce e câncer de pele. Seus

efeitos são mais marcantes do que os da radiação UV-A. A radiação UV-C tem maior potencial de dano à pele, porém não atravessa a camada de ozônio (THORNHIL, 1993).

Quando a luz UV alcança as células da pele (figura 1), os diferentes comprimentos de onda começam a exercer seus efeitos: a luz UV-A (UVA-1 e UVA-2) atua principalmente gerando radicais livres que irão posteriormente ser responsáveis pela peroxidação lipídica. Se houver deficiência de vitamina E intracelular, o radical livre irá se combinar com a molécula lipídica e liberar um átomo de oxigênio, iniciando uma peroxidação do lipídeo poliinsaturado que produz moléculas não ativas de peróxido. Estas moléculas de peróxido podem causar dano celular considerável (SALGADO, 2002). Já a radiação UV-B, embora possa também gerar radicais livres, tem como principal mecanismo de ação a interação direta com o DNA, causando a sua destruição (BENEMBURG et. al., 2000).

A quebra de ligações no DNA modifica proteínas no tecido da pele que produzem formas de carbonila que se acumula nas papilas dérmicas, essa proteinase provoca um dano no colágeno prejudicando a formação da pele, os raios UV bloqueiam o receptor do fator de crescimento tipo II, ativando outras proteínas que ativarão a collagenase (SOUZA, 2004).



**Figura 1:** Alcance das radiações UVA – UVB nas camadas da pele. (Fonte: blog bulle de beaute, 2008)

### **3.2 Estresses oxidativo**

O desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) / espécies reativas de nitrogênio (RNS) e remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ROS/RNS que causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002), em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecidos adiposo (BARJA DE QUIROGA, 1992; GOLDFARB, 1993), vascular (DUARTE et. al., 1993; FENSTER et. al., 2002) e cerebral (SIGNORINI, 1993; HALLIWELL, 1994; KEYNES & GARTHWAITE, 2004). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (NIESS et. al., 1999). Hábitos de vida inapropriados, tais como a ingestão de álcool, fumo e dieta inadequada; condições ambientais impróprias, tais como a exposição à radiação não ionizante UV e ondas curtas; poluição; alta umidade relativa e temperatura elevada; estados psicológicos que provocam estresse emocional (ELSAYED, 2001), o envelhecimento (DRÖGE, 2002) e o exercício realizado de forma extrema (ELSAYED, 2001) também estão associados ao estresse oxidativo.

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com conseqüências diretas em muitos processos patológicos entre eles; a indução do câncer e a propagação de AIDS em pacientes soropositivos (HIV+), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças autoimunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras (HALLIWELL, 1995). O reconhecimento

dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos.

### **3.2 Biomarcadores**

Segundo ZWART e colaboradores e LABAER, os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadoras de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores. Eles podem ser classificados, segundo os mesmos autores, como biomarcadores: de exposição, de efeito e de susceptibilidade. O biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: mostrar alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação e análise fáceis e de baixo custo; ser analisado por técnica não invasiva, de alta sensibilidade, no fluido biológico escolhido. Deve existir uma relação bem estabelecida entre a concentração do biomarcador e a exposição ao agente, ao dano induzido e à susceptibilidade pesquisada.

O sangue humano é uma excelente fonte de marcadores *in vivo* de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e endobióticos modificados por ação de ERRO e ERN. É considerada uma amostra biológica única, potencialmente mais informativa, já que, obtida de um indivíduo, pode descrever seu estado de saúde no momento da coleta (JACOBS et. al., 2005). Pode ser obtido em larga escala, com uma quantidade relativamente grande de proteínas (em mg), disponível para estudo de numerosas condições e estados de saúde (ANDERSON et. al., 2002).

### 3.3 Oxidação em eritrócito

A membrana do glóbulo vermelho contém grande número de grupos -SH, e os agentes oxidantes podem converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana (GILBERT & Mc LEAN, 1990). Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina (Hb) à Meta-Hb, que precipita e forma os corpúsculos de Heinz (RICE – EVANS & BAYSAL, 1987).

O componente lipídico da membrana eritrocitária está também sujeito à agressão oxidativa. Os produtos desta lipoperoxidação podem induzir o estresse oxidativo intracelular (RICE-EVANS et. al., 1986).

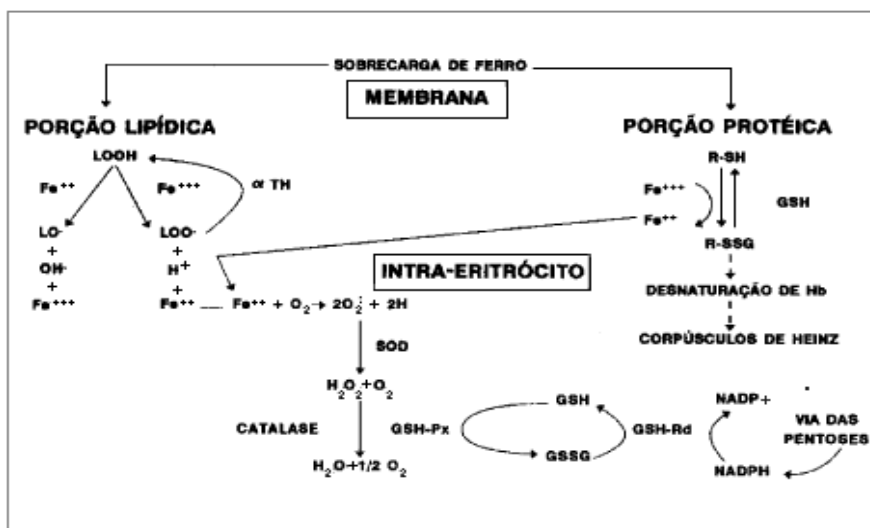
A associação dos fenômenos lipoperoxidação, formação de corpúsculos de Heinz e oxidação dos grupos-SH poderão promover a lesão da membrana do glóbulo vermelho. Se a eficiência do sistema antioxidante for superada pela magnitude destes fenômenos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise. A figura 2 esquematiza a relação destes processos, considerando o ferro como o agente agressor oxidante e o eritrócito como célula-alvo. No entanto, é possível generalizar este padrão de agressão e defesa celular antioxidante para grande parte dos tecidos do organismo.

Quando o eritrócito é submetido a estresse oxidativo, pode ocorrer a oxidação da hemoglobina e a formação de complexos de ferro (RICE EVANS & BAYSAL, 1987). A ligação do oxigênio à hemoglobina pode levar ao aparecimento de íons superóxido e à formação de metahemoglobina. Ao elevar-se a concentração de metahemoglobina a níveis tais que os mecanismos de redução não sejam suficientes para reconvertê-la a oxiemoglobina, inicia-se a formação de hemicromos, pela depleção do heme oxidado. O domínio citoplasmático das proteínas da banda 3 do citoesqueleto possui uma alta

afinidade pelos hemicromos (LEE et. al.,1999). A precipitação de hemicromos junto da membrana eritrocitária favorece a formação de agregados de alto peso molecular, resultantes de sua interação com proteínas da banda 3. Tal fato é notado com maior facilidade em doenças que resultam em maior suscetibilidade a danos oxidativos. Alterações na fluidez e na deformabilidade do eritrócito podem culminar com a associação de hemoglobina desnaturada junto à membrana celular (HARRIS, 1991).

Observou-se que eritrócitos têm sido usados como modelo para investigar danos oxidativos em biomembranas por causa de sua alta vulnerabilidade para peroxidação. A exposição de eritrócitos a condições como exercício e hipoxia conduzem peroxidação de lipídios, mudanças em morfologia celular, ligações cruzadas de proteínas, hemólise e alterações em proteínas da membrana (OKAMOTO et. al., 2004).

Embora os eritrócitos contenham um extenso sistema de defesa antioxidante, oxidações danificam proteínas de membrana e lipídios e contribuem à senescência de células normais que resulte em um tempo de vida menor para células danificadas. A principal fonte de ERO intracelular no eritrócito é autooxidação de oxihemoglobina que gera superóxido, e por dismutação produz peróxido de hidrogênio (NAGABABU et al., 2003). Neste sentido, o eritrócito tem-se mostrado um modelo eficiente para estudo de princípios ativos antioxidantes em modelos ex-vivo.



**Figura 2:** Mecanismo de lesão e proteção eritrocitária nas sobrecargas de ferro. A hemólise poderá ocorrer se a capacidade de defesa antioxidante for superada pela capacidade oxidativa do agente. (Fonte: FERREIRA & MATSUBARA, 1997)

### 3.4 Sistema Antioxidante do Eritrócito

O eritrócito dispõe de aparelhagens metabólica e estrutural especializadas, para manter a hemoglobina no seu estado funcional. Desta forma, transporta grande quantidade de oxigênio de forma relativamente segura para a sua integridade, graças a um complexo sistema de destoxificação, que previne o acúmulo de radicais livres e de outras espécies altamente reativas. O principal tampão redox do eritrócito é a GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido portador do grupo sulfidríla (SH), grupo empregado nas reações de oxido-redução nas quais a molécula participa (LEHNINGER et. al.,1995; STRYER,1996). A função da GSH é manter componentes diversos da célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons  $Fe^{++}$  de grupos heme. A GSH também atua como um



nucleófilo, com reatividade para se combinar com várias drogas, gerando metabólitos que facilitam a excreção urinária ou biliar desses xenobióticos (ESTEVEZ et. al.,1994). O mecanismo redox de remoção de peróxidos e de outros derivados reativos do O<sub>2</sub> envolve a oxidação da GSH, gerando o dímero denominado glutathiona oxidada (GSSG). A reação de dimerização da GSH é catalisada pela glutathiona peroxidase (GSHPx), uma das raras enzimas que utilizam o elemento selênio. A regeneração da GSSG por redução é realizada pela glutathiona redutase (GR), que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como fonte de elétrons. O NADPH é gerado em uma via alternativa do metabolismo da glucose, o ciclo das pentoses fosfato ou via das hexoses monofosfato. Deficiências ou comprometimentos nas enzimas deste metabolismo, especialmente a glucose-6-fosfato desidrogenase, aumentam enormemente a suscetibilidade do eritrócito ao estresse oxidativo (JANDL, 1996).

### **3.5 Defesas de antioxidantes presentes em plantas na pele**

O mecanismo de primeira linha de prevenção a ações de antioxidantes é feito por protetores solares orgânicos, seus mecanismos podem ser classificados em absorção, reflexão e difusão. Nos filtros orgânicos a luz ultravioleta é transformada em energia não danosa para a pele humana. A composição desses filtros geralmente é com grupos aromáticos, que apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição orto ou para do anel aromático. Ao absorver a radiação UV, os elétrons situados no orbital  $\pi$  HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para orbital  $\pi^*$  LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma

de calor. Previnem o dano ao DNA e inativam o gene responsável por um possível câncer como o p53 (FLOR, 2007).

Outro modo de proteção feito fotoprotetores provenientes de plantas é pela ação antioxidante em que se reduzem as espécies reativas, através de um limpador (figura 2), reduz o estresse oxidativo e reduz o dano ao gene oncogênico p53 (AFAQ, 2006).

A terceira linha de defesa é através de processos de redox que diminuem a inflamação e evitam a apoptose de células e as transformam, fazendo uma correção tecidual (AFAQ, 2006).

### **3.6 Uso de substancias antioxidante**

A principal função do sistema de defesa antioxidante do organismo é inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas do oxigênio (ROS). Existe uma grande variedade de substâncias antioxidantes, as quais podem ser classificadas em função da origem e/ou localização (JACOB, 1985).

Para a defesa do organismo existe o sistema antioxidante cutâneo que é formado por substâncias enzimáticas, dentre eles destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), são encontrados em células da epiderme chamadas queratinócitos. (AFAQ et. al. 2005). Outro grupo são os antioxidantes não enzimáticos como o caso de hormônios e como exemplo o ácido lipóico que apresenta atividade antioxidante e pode ajudar como regenerador de formas oxidadas de glutathione e alfa-tocoferol, bem como a melanina, que possui papel protetor contra a radiação UV.

A aplicação tópica ou oral de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes.

Pesquisa com plantas medicinais da América do Sul, fez uma avaliação preliminar analítica de um extrato etanólico da folha de *C. reflexum* (ECR), achando níveis altos de combinações fenólicas, especialmente flavonóides, de quem efetividade contra UV luz - induziu dano de pele é informado em literatura (BONINA et., 1996).

O *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K.Schum é indicada como uma planta de grande capacidade antioxidante e em estudos prévios, tendo a produção de cremes anti-envelhecimento em grande escala por empresas de cosméticos no estado do Amazonas. A espécie é encontrada em grande quantidade na região e sua parte utilizada é a casca, colocada em decocção e aplicada para infecções de pele por nativos da região amazônica. É uma árvore de grande porte, sua casca muda periodicamente, é fina e lembra uma pele, criando certa dificuldade quando é identificada. Mesmo com sua atividade medicinal comprovada, a espécie é utilizada em maior escala por indústrias madeireiras por sua madeira densa e de boa qualidade. (CARDONA, 2003)

Diversos estudos descritos na literatura abordam o uso de antioxidantes oriundos de produtos naturais. A eficácia de antioxidantes desta origem é extensamente investigada, principalmente frente aos efeitos da radiação UV, sendo utilizados alguns extratos como o de *Calendula officinalis*, *Polypodium leucotomo* (GOMES et al, 2001), de *Pothomorphe umbellata* (ROPKE et al, 2003), entre muitos outros, a fim de prevenir ou amenizar os efeitos causados pela radiação UV.

O chá verde, nome popular dado para a infusão obtida a partir da planta *Camellia sinensis*, é rico em catequinas, que são poderosos antioxidantes. Dentre os efeitos observados, podem-se citar a inibição da lipoperoxidação e dos danos causados

ao DNA pelas ERO, a inibição da imunossupressão e da inflamação cutânea induzida pela radiação UV, a indução de apoptose nas células tumorais e inibição do crescimento do tumor induzido pela radiação UV100. Além de ser consumido por quase um terço da população mundial, encontra-se também em produtos para uso tópico, apresentando efeitos semelhantes (KATIKYAR et. al, 1999).

Os antioxidantes naturais são promissores na prevenção do câncer de pele, pois muitos já mostraram seus efeitos anticarcinogênico e antimutagênico, além de baixa toxicidade (AFAQ, 2002). Assim, o uso de substâncias antioxidantes, por via oral ou tópica, pode auxiliar os sistemas endógenos de proteção da epiderme, além de contribuir para prevenção de problemas a longo prazo ( STEENVOORDEN, 1997).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Matéria prima vegetal**

Os extratos selecionados no presente projetos foram elaborados e cedidos pela Profa. Dra.Tatiane Pereira de Souza. Foram escolhidos pelo menos três extratos de plantas diferentes com potencial uso como dermocosméticos.

### **4.2 Eritrócitos**

Foi coletada uma amostra de 4,5 ml de sangue humano adultos. O sangue foi adicionado a um tubo contendo EDTA e centrifugado a 2500 rpm por 15 min para obtenção de um concentrado de eritrócitos. Os eritrócitos foram lavados três vezes com soro fisiológico numa proporção 1:1 e em seguida diluídos também com o soro para obtenção de uma solução de eritrócitos (50%) a qual foi utilizada nos experimentos.

### **4.3 Modificações oxidativas do eritrócito mediada por radiação UV**

A solução de eritrócitos foi submetida a diferentes tempos de oxidação mediada por radiação UV com exposição direta a aproximadamente 20 cm de uma lâmpada com emissão a 354 nm, e posteriormente submetida aos testes de avaliação dos biomarcadores da oxidação.

## **4.4 Marcadores da oxidação no eritrócito**

### **4.4.1. Alterações na forma e volume**

Após exposição dos eritrócitos a oxidação foi confeccionado um esfregaço que em seguida foi corado pelo método de Leishman e a forma do eritrócito foi visualizada em um microscópio ótico. A solução também foi submetida a uma leitura automatizada pelo equipamento KX-21N (Sysmex) onde foram analisados parâmetros relacionados à forma e ao tamanho do eritrócito.

### **4.4.2. Hemólise**

Testes foram realizados para estabelecer as condições de hemólise. Foi adicionada a amostra contendo hemoglobina 400 $\mu$ L de soro fisiológico e centrifugado a 1500rpm por 5 minutos. Separado o sobrenadante e o infranadante da amostra foi feita a reação do Drabkin, obtida através do reagente de Drabkin em que a Hb, em presença do reagente, forma um composto, a cianometahemoglobina. No infranadante utilizou-se o reagente Triton X- 100 como hemilozante. A leitura da absorbância foi absorvida a 540 nm.

#### **4.4.3. Dosagem do MDA**

Um dos parâmetros para monitorar a oxidação dos eritrócitos foi os níveis de malondialdeído (MDA). A dosagem dos níveis de malondialdeído foi realizado segundo ARGUELLES et. al. (2004). Para determinação dos níveis de MDA utilizou-se 100 uL da solução de eritrócitos adicionados a 1 mL de uma solução contendo ácido tricloroacético a 10 % e ácido tiobarbitúrico a 1 % em ácido clorídrico 0,25 N. Esta mistura foi aquecida em banho-maria por 30 minutos e depois centrifugada. A absorbância do sobrenadante foi medida a 535 nm. A concentração das amostras foi determinada a partir da leitura de uma amostra com concentração conhecida (padrão) de malondialdeído a 4  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **4.4.2. Dosagem das proteínas carboniladas**

A oxidação das proteínas dos eritrócitos foi mensurada pela determinação de grupamentos carbonilas baseados na reação com dinitrofenilhidrazina (LEVINE et al., 1990). Para a realização do experimento foram utilizado os reagentes: Guanidina 6 M , DNPH, HCl 2,5 M, Ácido Tricloroacético (TCA) 10% e 20% e Etano/Acetato de Etila 1:1 para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes. Inicialmente utilizou-se DNPH para a reação com as carbonilas da amostra. Para cada amostra, utilizou-se outro tubo para medida de proteína total da amostra. Esse tubo referiu-se ao “branco”, e as concentrações utilizadas foram as mesmas para medida das carbonilas. A quantidade de carbonilas foi determinada espectrofotometricamente em 360nm usando um coeficiente de extinção molar de 22.000

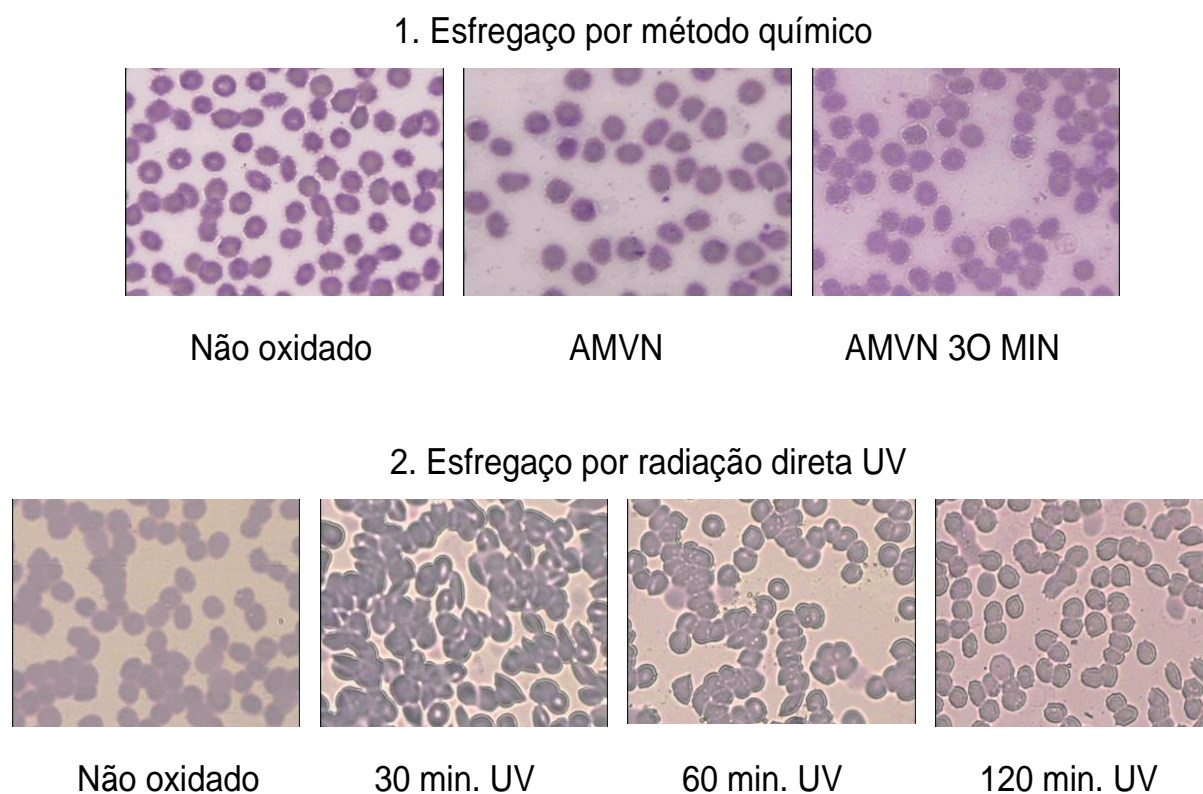
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Marcadores da oxidação no eritrócito

#### 5.1.1. Alterações na forma e volume

A solução de eritrócitos foi submetida aos tempos de oxidação 30,60 e 120 minutos, mediada por radiação UV com exposição direta; confeccionado um esfregaço de cada tempo; corado e a forma do eritrócito foi visualizada em um microscópio ótico.

De acordo com a figura 3 percebe-se que quando observadas microscopicamente as amostras não apresentaram alteração significantes na forma e no volume da célula.



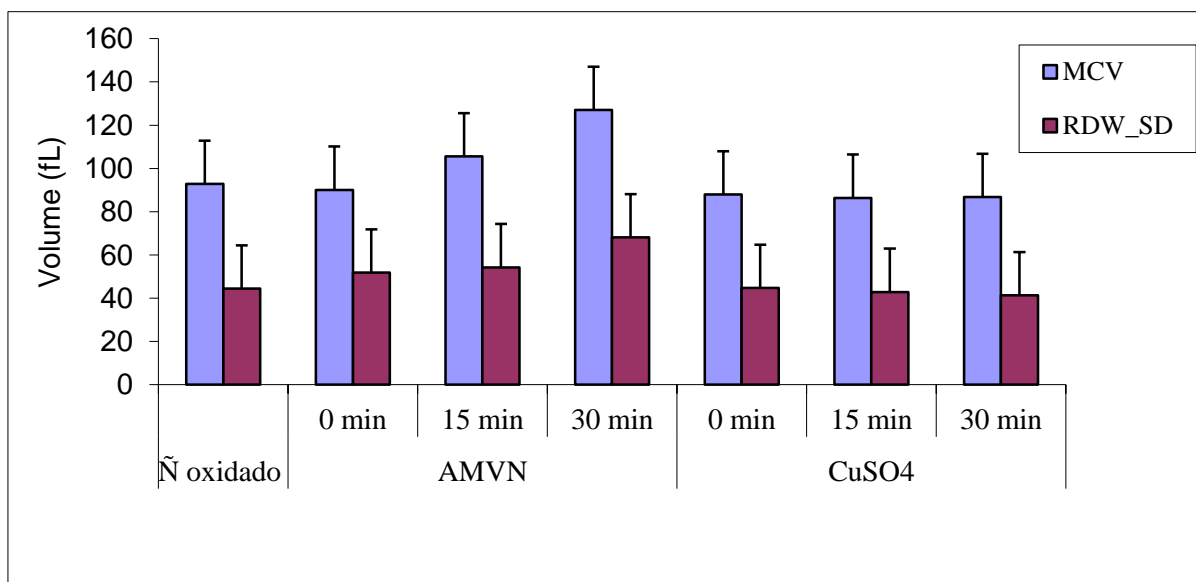
**Figura 3:** Esfregaço utilizando AMVN como agente oxidante no método químico em comparação por radiação direta ao UV em diferentes tempos de exposição.



A solução a qual foi submetida à leitura automatizada pelo equipamento KX-21N (Sysmex), foi avaliada por método químico utilizando o agente oxidante AMVN e por exposição direta a radiação UV; avaliando os índices de Volume Corpuscular Médio (MCV) em fentolitros e a medida direta também em fentolitros da largura da curva de distribuição das hemácias de acordo com o volume eritrocitário (RDW\_SD). Ambos estão relacionados à forma e ao tamanho do eritrócito.

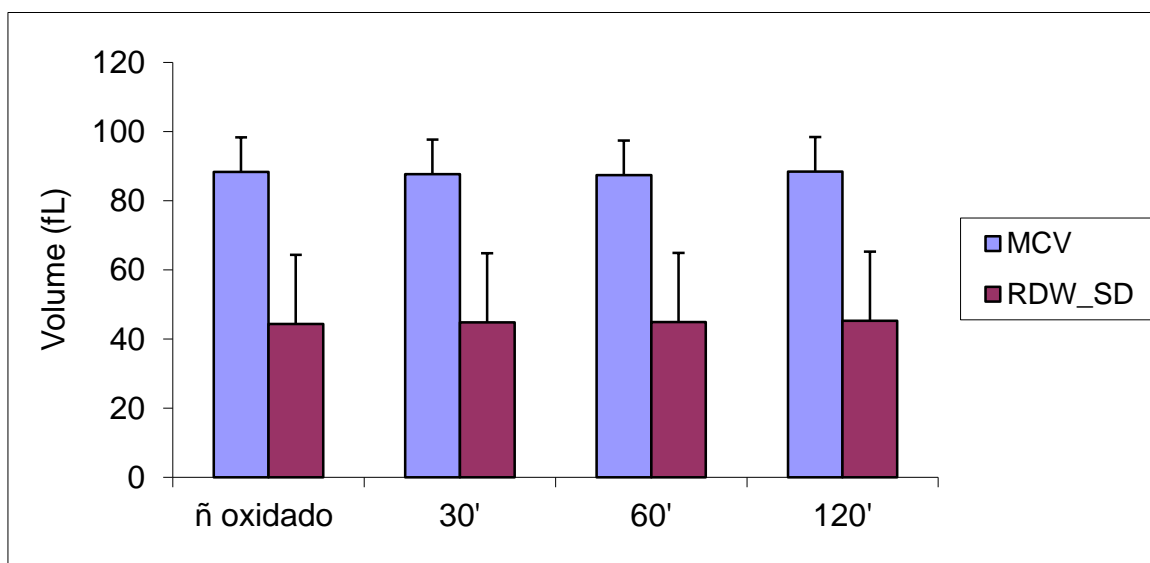
De acordo com a tabela 1, no método químico apenas o índice MCV sofreu alterações quando utilizado o AMVN nos tempos 15 e 30 minutos; assim como RDW\_SD que também sofreu alterações apenas nas amostras com AMVN. Para o método com exposição direta a radiação UV ambos os índices MCV e RDW\_SD não sofreram alterações (tabela 2). As alterações são comparadas aos valores de referência já descritos na literatura, contudo não são alterações significativas.

### Método Químico:



**Tabela 1:** Índices hematimétricos (MCV e RDW\_SD) utilizando AMVN e CuSO4 como agente oxidante em comparação a diferentes tempos, ambos os índices medidos em fentolitros.

### Método de Radiação Direta UV:

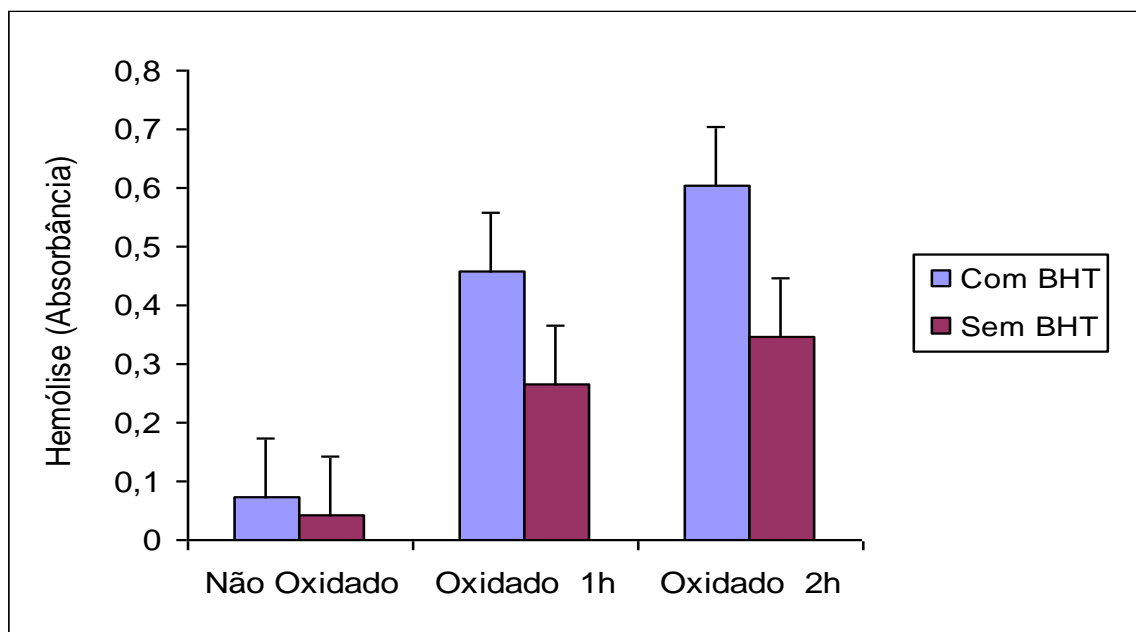


**Tabela 2:** Índices hematimétricos (MCV e RDW\_SD) utilizando a exposição direta ao UV como agente oxidante em comparação a diferentes tempos.

#### 5.1.2 Hemólise

Testes foram realizados para estabelecer as condições de hemólise utilizando o reagente Triton X- 100 como hemilozante e exposição direta por radiação UV. Foi utilizado solução de hemácias a 50%. A dosagem de hemoglobina no hemolisado foi obtida através do reagente de Drabkin (2 mL do reagente + 50µL da amostra) que é absorvida a 540 nm.

Conforme a tabela 3 a absorbância de hemólise nas amostras tratadas com BHT foram maiores quando comparadas com as amostras sem o antioxidante, demonstrando que não foi eficiente a utilização de um antioxidante para proteção da hemólise.



**Tabela 3:** Absorbância de hemólise em amostra não oxidadas e oxidadas em diferentes tempos de exposição UV com e sem antioxidante padrão.

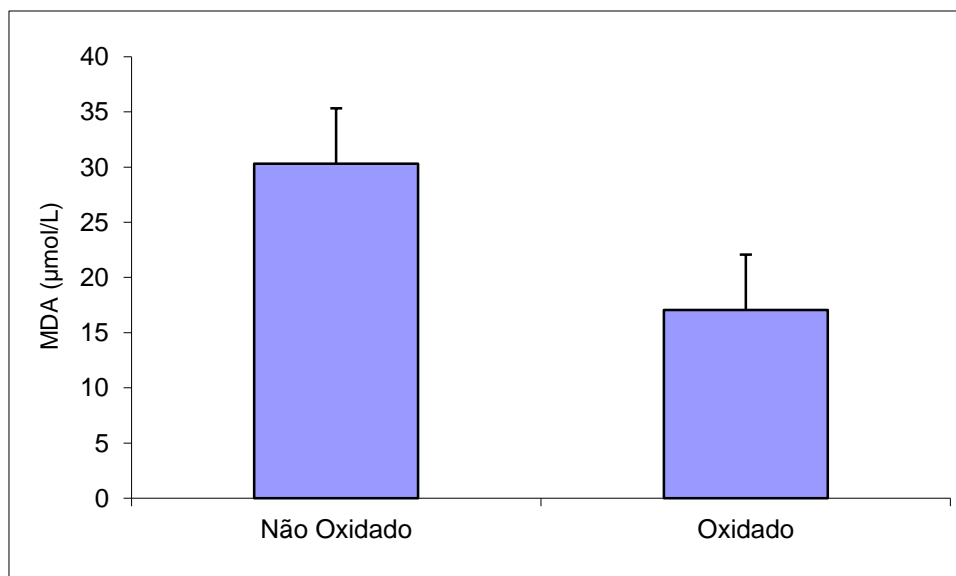
### 5.1.3. Dosagem do MDA

Para a monitoração da oxidação do eritrócito foi utilizada a solução de eritrócitos (50%) e exposição direta a radiação UV por 60 minutos. Os níveis de malondialdeído foram determinados pela reação de TBARS. A solução também foi submetida a monitoração utilizando AMVN e  $\text{CuSO}_4$  para o método químico seguindo o mesmo procedimento e tempo de exposição direta.

Para o método de exposição direta ao UV a concentração de MDA em  $\mu\text{mol/L}$  foi maior nas amostras não expostas em relação as oxidadas ao UV conforme a tabela 4. No método químico as amostras com o oxidante; tanto AMVN quanto  $\text{CuSO}_4$ ; apresentaram concentrações de MDA maiores que nas amostras sem os agentes oxidantes (tabela 5). A baixa concentração de MDA formado nas amostras que

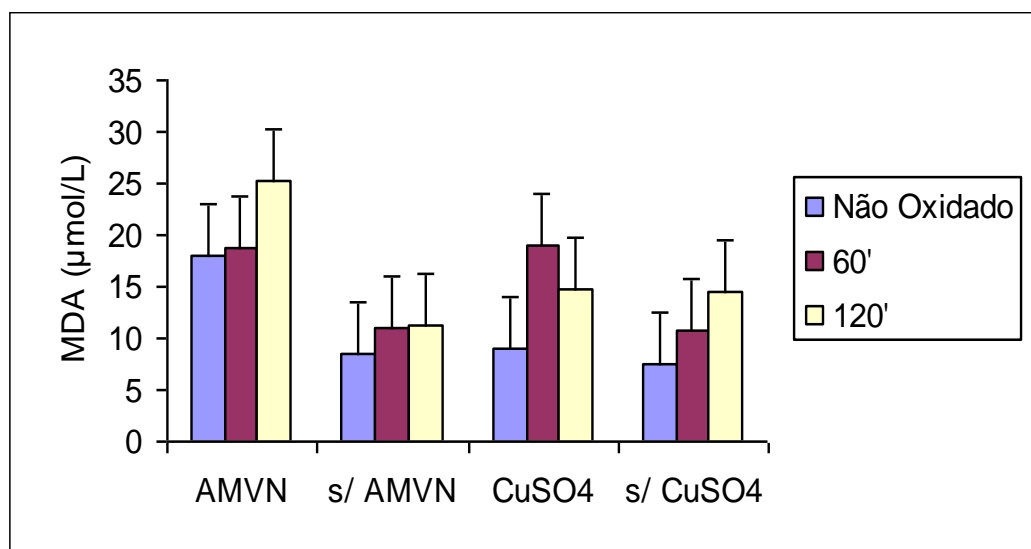
receberam exposição a radiação UV mostra que o método não foi válido na oxidação de lipídios.

#### Método de radiação direta UV:



**Tabela 4:** Concentração de Malondialdeído em amostras induzidas a oxidação por exposição a radiação direta ao UV.

#### Método Químico:

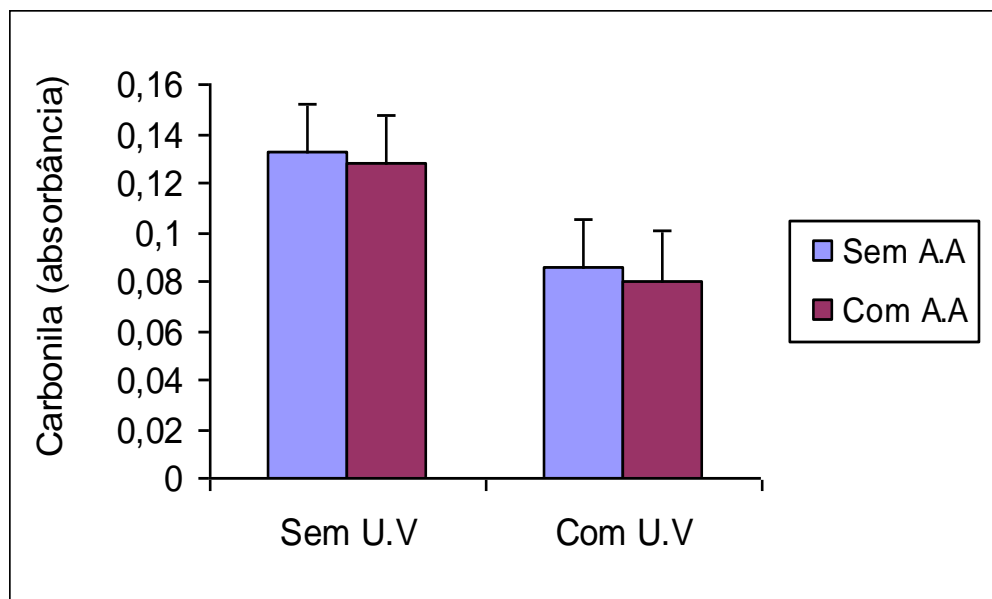


**Tabela 5:** Concentração de Malondialdeído em amostras induzidas a oxidação Com/Sem presença de agente oxidante em diferentes tempos de exposição ao UV.

#### **5.1.4. Dosagem das proteínas carboniladas**

Na medição de oxidação de proteínas foram adicionados 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de solução de eritrócito para a reação do DNPH, nos outros tubos colocou-se 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de HCl 2,5 M. Os tubos foram incubados por uma hora, em local escuro e agitados a cada 15 minutos. Após foi adicionado solução de TCA 20% nos tubos, colocados no gelo por 10 mm e depois centrifugados por 5 mm em centrífuga a 3000 rpm. Aproveitou-se o precipitado e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, acrescentou-se TCA 10% ao precipitado agitando-se com bastão de vidro, centrifugando por cinco minutos e, finalmente, o precipitado foi lavado por três vezes com etanol - acetato de etila. O precipitado final foi dissolvido em guanidina 6 M e agitado por 10 mm à 37 °C. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 360 nm. A proteína total da amostra foi lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm.

A absorvância de carbonilas presente nas amostras com Ácido Ascórbico exposto a radiação UV foi menor que nas amostras não oxidadas por UV e sem antioxidante, demonstrado na tabela 6. Os resultados mostram que sem exposição UV a formação de grupamento carbonila foi maior que as amostras sem exposição, demonstrando nenhuma diferença significativa no dano em proteína.



**Tabela 6:** Absorbância de carbonila em amostra não expostas e expostas à radiação direta UV.

## 6. CONCLUSÃO

Os biomarcadores utilizados nesse estudo mostraram-se ao final não ser eficientes em monitorar a oxidação mediada por radiação UV. As alterações medidas foram relativamente baixas ou inexistentes nas doses de radiação empregadas, inviabilizando o uso do método proposto para o estudo de extratos vegetais como protetores da radiação UV em eritrócitos.

## 7. REFERÊNCIAS

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, v.15, p. 297–306, 2002.

AFAQ F, ADHAMI VM, MUKHTAR H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res.*, cp.571, p:153-73, 2005.

AFAQ, F., MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol*. v. 15 n.9, p. 678-84, 2006.

AKTER, et.al. Effects of several agents on uvb- and uva plus systemic fluoroquinolone-induced erythema of guinea pig skin evaluated by reflectance colorimetry; *Free Radical Biology & Medicine*, v. 24, n. 7/8, p. 1113–1119, 1998.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G.; *MOL. CELL PROTEOM.* 2002, 1, 845.

97 CORDOVA, C. A. S.; SIQUEIRA, I. R.; NETTO, C. A.; YUNES, R. A.; VOLPATO, A. M.; FILHO, V. C.; CURI-PEDROSA, R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; *Redox Rep.*, v.7, p.95, 2002.

ARGUELLES, S. GARCIA, S. MALDONADO, M. MACHADO, A. AYALA, A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta* ; v.1674, p.251-9, 2004.

BARJA DE QUIROGA G. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress. *Free Radic Biol Med*; v.13, p:325-40, 1992.

BENEMBURG M, PLETTENBERG H, KRUTMANN J. Photoaging of human skin. *Photodermathol Photoimmunol Photomed.*; v.16, cp.6, p:239-44, 2000.

BENDERITTER, M. VINCENT-GENOD, L., POUGET J. P., VOISIN, P. The Cell Membrane as a Biosensor of Oxidative Stress Induced by Radiation Exposure: A Multiparameter Investigation ; *radiation research* v.159, p. 471–483, 2003.

BENNETT, V., Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Meth. Enzymol.* n. 96, p. 313- 324, 1981.

BONINA F., LANZA M., MONTENEGRO L., PUGLIS C., TOMAINO A., TROMBETTA D., CASTELLI F., SAIJA A., Flavonoids as potential protective agents photo-oxidative skin damage. *Int. J. Pharmac.*, v.145, p. 87-94, 1996.

CASAGRANDE, R., GEORGETTI, S.R., VERRI, W.A.; et.al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* n. 84 p.21–27, 2006.

CARDONA ZULETA LM, CAVALHEIRO AJ, SIQUEIRA SILVA DH, FURLAN M, MARX YOUNG MC, ALBUQUERQUE S, CASTRO-GAMBOA I, DA SILVA BOLZANI V., Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae)., *Phytochemistry.* v.64, cp.2, p:549-53, 2003.



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

DUARTE JA, APPELL HJ, CARVALHO F, BASTOS ML, SOARES JM. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med.*, v.14, p:440-3, 1993.

ESTEVEZ, F.; DE ANGELO, T.; VESSEL, E. Basal and paracetamol-depleted glutathione from human lymphocytes. *Acta Physiol. Pharmacol. Latino Americana*, v. 44, p.48-54,1994.

ELSAYED, N.M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition*, Parsippany, v.17, n.10, p.828-834, 2001.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. *Quim.Nova*, Araraquara, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

FENSTER CP, WEINSIER RL, DARLEY-USMAR VM, PATEL RP. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes Res*; v.10, p:964-8, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GILBERT HF, MC LEAN VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; v.63, p: 69-172, 1990.

GOLDFARB AH. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*; v. 25, p:232-6, 1993.

GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A. C.; BRAZ. *J. Med. Biol. Res.*, v.34, p.1487, 2001.

GUARATINI, T. MEDEIROS, M. H.G., COLEPICCOLO, P. et. al. Antioxidantes na Manutenção do Equilíbrio Redox Cutâneo: Uso e Avaliação de Sua Eficácia. *Quim. Nova*, v. 30, n. 1, p.206-213, 2007

HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*; v.52, p:253 -65, 1994.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.35, p.7, 1995.

HARRIS, J. R. *Blood cell biochemistry*. London: Plenum Press,: Erythroid Cells., v.3, Cap. 7, 1991.

HARVEY, J. W.; STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A.; JOHNSON, P. J; DONALD, J. J.; CHANDLER, C. J. Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency; *Veterinary Pathology*, v.40, n.6, p.632-42, 2003.

HILDESHEIM J, AWWAD RT, FORNACE, AJJ. p38 mitogen activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. J Investig Dermatol Symp Proc.; cp. 122, v.2, p:497-502, 2004.

JACOB, M.J. The integrated antioxidants systems. Nutr Res, New York, v.15, n.4, p.755-782, 1985.

JACOBS, J. M.; ADKINS, J. N.; QIAN, W-J.; LIU, T.; SHEN, Y.; CAMP II, D. G.; SMITH, R. D.; J. Proteome Res., v.4, p.1073, 2005.

JANDL, J. H. Blood: textbook of hematology. 2. ed. Boston: Brown and Company, p. 505-506, 1996.

KATIKYAR, S. K.; YOSHIDA, Y.; MATSUI, M. S.; COOPER, K. D.; MUKHTAR, H.; Photochem. Photobiol., p.69S, 1999.

KEYNES RG, GARTHWAITE J. Nitric oxide and its role in ischaemic braininjury. Curr Mol Med; v.4, p: 179-91, 2004.

LABAER, J.; J. Proteome Res., v.4, p.1053, 2005.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. Wintrobe's Clinical Hematology. 10. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 196-217, 1999.

LEHNINGER, A.; NELSON, B.; COX, M. Princípios de Bioquímica. Sarvier, 3. ed., São Paulo, 1995.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG, ET AL. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol; , v.186, n.464, p.78, 1990.

NAGABABU, E., CHREST, F.J., RIFKIND, J.M. Hydrogen peroxideinduced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. Biochimica Biophysica Acta (1620), p.211–217, 2003.

NISS AM, DICKHUTH HH, NORTHOFF H, FEHRENBACH E. Free radicals and oxidative stress in exercise – imunological aspects. Exerc Immunol Rev; v.5, p:22-56, 1999.

OKAMOTO, K., MARUYAMA, T., KAJI, Y., HARADA, M., MAWATARI, S.,FUJINO, T., UYESAKA, N. Verapamil prevents impairment in filterability of human erythrocytes exposed to oxidative stress; Japanese Journal of Physiology; n.54, p.39–46, 2004.

OKUNO, E.; VILELA, M. A. C. Radiação ultravioleta: Características e efeitos. 1. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2005.

QUINN AG. Ultraviolet radiation and skin carcinogenesis. Br J Hosp Med.; v.58, cp. 6, p:261-4, 1997.

RICE-EVANS, C. A.; BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. Biochemical Journal, London,, v. 244, p. 191-196, 1987.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M.; Photochem. Photobiol., v.78, p.436, 2003.

SALGADO JM., Nutrição na terceira idade. In: Brunetti R, Montenegro LF, editores. Odontogeriatrics-noções de interesse clínico. São Paulo: Artes Médicas; p.61-70, 2002.

SIGNORINI JL, SIGNORINI SL. Atividade física e radicais livres. Aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. São Paulo,Cone, 1993.

SOUZA, V. M. Ativos Dermatológicos. São Paulo: Tecnopress. p.23-25. 2004.

STEENVOORDEN, D. P. T.; VAN HENEGOUWEN, G. M. J. B.; J. Photochem. Photobiol., v.1, p.41, 1997.

STRYER, L. Biochemistry. New York: W. H. Freeman and Company, 4. ed., p. 131-135, 1995.

THORNHIL MH. The sun, the ozone layer and the skin: the role of ultraviolet light in lip and skin cancer. *Dental Update.*; v.20, cp.6, p:236-40, 1993.

WULF HC, SANDBY-MOLLER J, KOBAYASI T, GNIADDECKI R. Skin aging and natural photoprotection. *Micron.*; v.35, cp.3, p:185-91, 2004.

ZWART, L. L. ; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E.; *Free Radical Biol. Med.*, v.26, p.202, 1999.