

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

AValiação dos Níveis de Lipoperoxidação e Carbonilação Proteica em Eritrócitos de Mulheres Climatéricas Tratadas In Vitro com a Infusão de Cymboogon Citratus¹

Gabriela Tassotti Gelatti², Roberta Cattaneo Horn³, Natacha Cossetin Mori⁴, Ana Caroline Tissiani⁵, Daiana Gewehr⁶, Evelise Moraes Berlezi⁷.

¹ Projeto vinculado ao Grupo de Pesquisa Ciências - UNICRUZ e ao Grupo de Pesquisa em Envelhecimento Feminino - UNIJUI

² Farmacêutica, aluna do Curso de Mestrado em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUI). Bolsista CAPES. E-mail: gabriela.gelatti@hotmail.com

³ Farmacêutica. Docente da UNICRUZ. E-mail: robertacattaneo82@gmail.com

⁴ Farmacêutica. Aluna do Curso de Mestrado em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUI). E-mail: natachamori@msn.com

⁵ Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina da UNICRUZ, Bolsista PAPCT/UNICRUZ. E-mail: ana.c.t@hotmail.com

⁶ Aluna do Curso de Graduação em Farmácia da UNIJUI. E-mail: daiagewehr@hotmail.com

⁷ Fisioterapeuta. Docente da UNIJUI. E-mail: evelise@unijui.edu.br

Introdução

O climatério é a fase da vida da mulher em que ocorre a transição do período reprodutivo para o não-reprodutivo. O Ministério da Saúde estabelece o limite etário para o climatério, período entre 40 a 65 anos de idade, dividido em: pré-menopausa, onde há diminuição da fertilidade em mulheres com ciclos menstruais regulares ou com padrão menstrual similar ao ocorrido durante a vida reprodutiva; perimenopausa que inicia dois anos antes da última menstruação e vai até um ano após (com ciclos menstruais irregulares e alterações endócrinas) e pós-menopausa que inicia um ano após o último período menstrual (FEBRASGO, 2004).

A diminuição da fertilidade e, progressivamente, o declínio dos níveis de estrogênio plasmático que ocorre na menopausa tem mostrado aumentar os níveis de marcadores oxidativos no organismo, destacando-se a carbonilação proteica e a peroxidação lipídica (VOSS e SIEMS, 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012). Este aumento nos níveis de lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteínas e os danos causados ao ácido desoxirribonucleico (DNA), são indicativos de estresse oxidativo que ocorre em função da alta produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou deficiência na ação antioxidante do organismo (BARBOSA et al., 2010; HALLIWELL, 2012).

Salienta-se que excesso de EROs no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Dentre os antioxidantes provenientes da alimentação destaca-se o alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). As plantas constituem uma importante fonte de compostos fenólicos, tais como os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

os tocoferóis (NEVES e CUNHA, 2006; ANGELO e JORGE, 2007) e estudos revelaram a presença destes componentes fitoquímicos em extratos das folhas de *Cymbopogon citratus* (ALVIS, MARTINEZ e ARRAZOLA, 2012; SOARES et al., 2013).

O *Cymbopogon citratus* é conhecido popularmente como capim limão ou capim cidreira e é indicado como antiespasmódico, sedativo leve e ansiolítico (BRASIL, 2011). Estas propriedades medicinais podem ser atribuídas ao seu elevado teor de óleo essencial, o citral, que além de eficácia terapêutica, parece ser um potente captador de EROs, promovendo redução das mesmas (HALABI e SHEIKH, 2014).

Sendo assim, considerando que segundo a literatura as mulheres no período da menopausa apresentam um aumento dos níveis de marcadores de estresse oxidativo devido à redução dos níveis estrogênio nessa fase, este estudo tem como objetivo avaliar os níveis de LPO e carbonilação proteica em eritrócitos de mulheres climatéricas tratadas *in vitro* com a infusão de *Cymbopogon citratus*.

Metodologia

O presente estudo está vinculado aos seguintes projetos de pesquisa: “Estudo do efeito antioxidante de diferentes princípios ativos” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) sob Parecer Consubstanciado nº 15510413.3.0000.5322 e “Estudo multidimensional de mulheres no processo de envelhecimento” da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) aprovado pelo CEP da UNIJUÍ sob Parecer Consubstanciado nº 294.456.

As folhas de *Cymbopogon citratus* foram coletadas do horto da UNICRUZ, e após previamente identificadas no laboratório de Botânica desta mesma universidade. A infusão foi preparada segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011).

Foram incluídas neste estudo 28 mulheres participantes do projeto de pesquisa intitulado “Estudo multidimensional de mulheres no processo de envelhecimento”. Foi aplicado um questionário na residência das participantes, sendo que as variáveis de interesse para este estudo foram: idade, informações sobre o ciclo menstrual e doenças que acometem essas mulheres. As coletas de sangue das participantes foram realizadas nas Estratégias da Saúde da Família (ESFs) de Ijuí, com o uso de vacutainers contendo Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). As amostras foram centrifugadas imediatamente a 3000 rpm durante 10 minutos e os plasmas foram removidos. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina isotônica e centrifugados novamente. Após a lavagem final, os eritrócitos foram ressuspensos em solução salina, em seguida, diluídos até atingirem um hematócrito de 5%, conforme técnica descrita por Catalgol et al. (2007), com adaptações. Após a diluição dos eritrócitos as amostras foram divididas em grupos, sendo que para cada grupo foram utilizadas 1500 µL de hemácias a 5%. Os eritrócitos foram subdivididos em seis grupos experimentais: Grupo 1: basal (sem tratamento); Grupo 2: tratado com a infusão de *Cymbopogon*

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

citratus a 5 g/L; Grupo 3: tratado com a infusão de *Cymbopogon citratus* a 10 g/L; Grupo 4: tratado com a infusão de *Cymbopogon citratus* a 25 g/L; Grupo 5: tratado com a infusão de *Cymbopogon citratus* a 50 g/L.

O tratamento com a infusão da planta foi realizada *in vitro* por 1 hora em banho-maria a 37°C, após este período as amostras foram hemolisadas com agitação em vórtex durante 10 segundos e centrifugadas a 3600 rpm durante 15 minutos, tendo como produto final a separação do sobrenadante, que foi armazenado em freezer a -20°C.

Para dosar a LPO foi utilizada a determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) segundo técnica de Stock e Dormandy (1971). Para a quantificação das Proteínas Carboniladas (PCs) foi utilizado o método descrito por Levine et al. (1990) adaptada para eritrócitos. As proteínas totais (PTs) foram determinadas a partir do Kit Labtest® para realizar o cálculo das PCs.

Os resultados foram expressos por média±SEM (erro padrão) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey-Kramer, considerando as médias significativamente diferentes, com um $P < 0,05$.

Resultados e discussão

As 28 participantes do estudo apresentaram idade média de 49±8,4 anos, com mínima de 38 e máxima de 65 anos. Quanto ao ciclo menstrual, 25,7% das mulheres estavam com o ciclo regular, 27,9% com ciclo irregular e 46,4% estavam em amenorreia. Com relação às doenças, 42,9% eram hipertensas, 14,3% diabéticas, 3,6% osteoporose e 17,9% possuíam alguma doença respiratória.

A formação de produtos de peroxidação lipídica é altamente prejudicial ao organismo, pois podem alterar a permeabilidade, a fluidez e a integridade das membranas, e eventualmente resultar em citotoxicidade grave, dando origem ao crescimento celular descontrolado ou a morte celular (UMESH e RAMANA, 2013). Verificou-se neste estudo que no grupo tratado com 25 g/L de *Cymbopogon citratus* houve redução significativa dos níveis de LPO em relação ao grupo basal e aos grupos tratados com 10 e 50 g/L da infusão da planta, mostrando que a mesma apresentou uma aparente ação antioxidante na concentração de 25 g/L (Figura 1).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

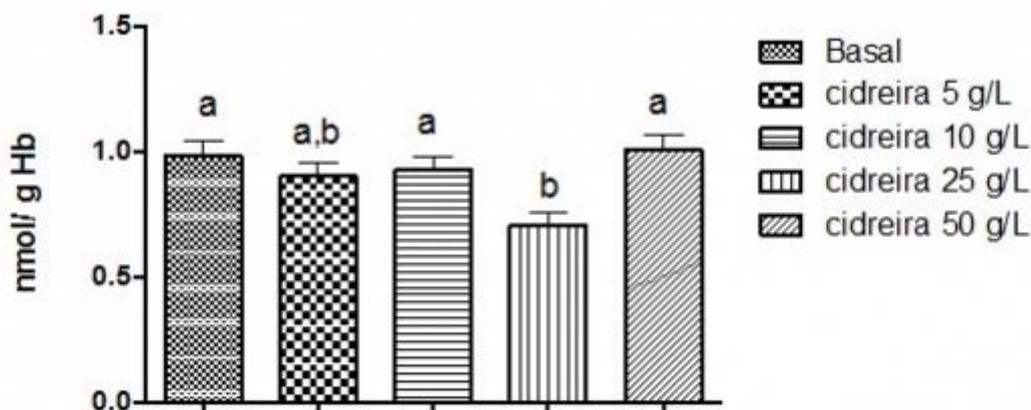
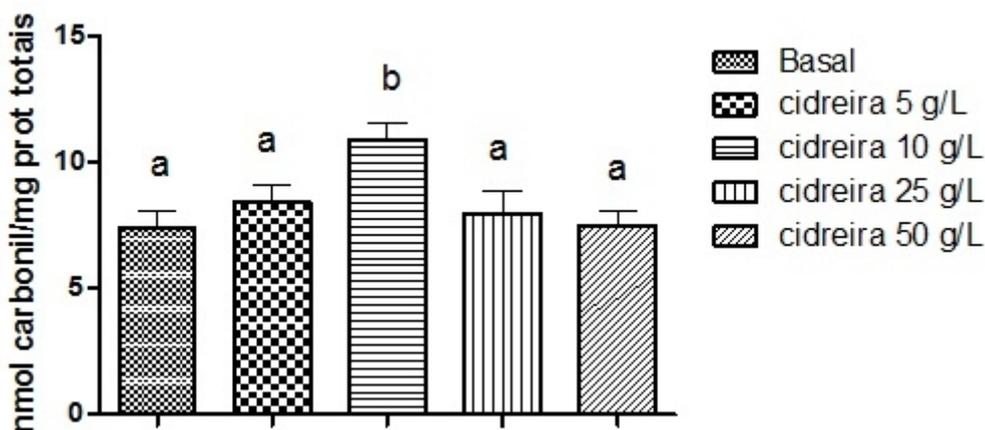


Figura 1: Dosagem dos níveis de TBARS nos eritrócitos de mulheres climatéricas tratadas com a infusão de *Cymbopogon citratus* em diferentes concentrações. Letras distintas representam resultados estatisticamente significativos, considerando $p < 0,05$.

Estudos têm mostrado um aumento nos níveis de PCs em decorrência do envelhecimento (VOSS e SIEMS, 2006). Segundo Grune et al. (2001), esse aumento de PCs pode ser resultado de um declínio na atividade do proteossoma, reduzindo assim a degradação de proteínas oxidadas. Além disso, sabe-se que as proteínas danificadas e modificadas podem formar ligações cruzadas e fornecer uma base para muitas alterações associadas à senescência e ainda contribuir para uma variedade de patologias (HOHN, KONIG e GRUNE, 2013). Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram níveis mais elevados de PCs após o tratamento com 10 g/L de *Cymbopogon citratus*, mostrando que nesta concentração a planta mostrou ser tóxica as proteínas (Figura 2).



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

Figura 2: Dosagem dos níveis de PCs nos eritrócitos de mulheres climatéricas tratadas com a infusão de *Cymbopogon citratus* em diferentes concentrações. Letras distintas representam resultados estatisticamente significativos, considerando $p < 0,05$.

Conclusões

O presente estudo revelou que a infusão de *Cymbopogon citratus* dependendo da concentração utilizada pode ser benéfica ou tóxica ao organismo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; plantas medicinais; menopausa.

Referências bibliográficas

- ALVIS, A; MARTÍNEZ, W.; ARRAZOLA, G. Obtención de Extractos Hidro-Alcohólicos de Limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como Antioxidante Natural. *Informação Tecnológica*, v.23, n.2, p.3-10, 2012.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- BARBOSA, K.B.F.; et al. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*. Brasília. 2011.
- CATALGOL, B.K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effect of trichlorfon on molondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicology In Vitro*, v.21, n.8, p.1538-1544, 2007.
- FEBRASGO. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. *Climatério: manual de orientação*. São Paulo: Ponto; 2004.
- GRUNE, T.; SHRINGARPURE, R.; SITTE, N.; DAVIES, K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *The Journals of Gerontology: Biological sciences and medical sciences*. v.56, n.11, p.459-467, 2001.
- HALABI, M.F.; SHEIKH, B.Y. Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. *BioMed Research International*, v.2014, 2014.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, v.70, p.257-265, 2012.
- HOHN, A.; KONIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*, v.30 n.92, p.132-159, 2013.
- LEVINE, R.L., et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v.186, p.464-478, 1990.
- NEVES, J.M.; CUNHA, S. Plantas Mediciniais. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, v.3, p.50-57, 2006.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XX Jornada de Pesquisa

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.A.; et al. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause*, v.19, n.3, p.361-367, 2012.

SOARES, M.O.; et al. Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. *Food and Chemical Toxicology*, v.60, p.413-418, 2013.

STOCK, J.; DORMANDY, T.L. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *British Journal of Haematology*, v.20, n.1, p.95-111, 1971.

UMESH, C.S.Y.; RAMANA, K.V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2013, p.1-11, 2013.

VOSS, P.; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radical Research*, v.40, n.12, p.1339-1349, 2006.