

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Platonia insignis* Mart. (CLUSIACEAE)**

**Michelle Mara de Oliveira LIMA (1); Laryany Farias VIEIRA (2); Joaquim Soares da COSTA JUNIOR (2)**

(1) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, Endereço: Praça da Liberdade nº 1597, Centro, Teresina - Piauí  
Telefone: (86) 215-5224 / Fax: 215-5206 CEP: 64.000-040, e-mail: [michellelima@oi.com.br](mailto:michellelima@oi.com.br)

(2) Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, UNED – Floriano-PI, Rua Francisco Urquiza Machado nº 462,  
Bairro Meladão, e-mail: [jquimjr@gmail.com](mailto:jquimjr@gmail.com)

### **RESUMO**

O Bacuri (*Platonia insignis* Mart.) é uma planta nativa da região amazônica e do nordeste do Brasil. O óleo extraído das sementes é muito utilizado como cicatrizante e anti-inflamatório na medicina popular. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas em suas defesas (enzimas) antioxidantes permitem estudar a ação antioxidante da graxa da semente do bacuri *in vivo*. A avaliação *in vitro* do potencial antioxidante dos extratos foi feita utilizando o método com reagente DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) como radical livre. O objetivo foi avaliar as possíveis atividades antioxidantes da banha extraída das sementes do bacuri na modulação dos efeitos de drogas oxidantes em linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mutadas nas defesas antioxidantes e através do radical DPPH. Os resultados mostraram que a graxa de *P. insignis* Mart possui efeitos citotóxicos em pré-tratamento com os mutantes da *S. cerevisiae* defectivas na expressão da superóxido dismutase na concentração de 2 mg/mL e não inibe os danos oxidativos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo possíveis atividades pró-oxidantes nas concentrações testadas *in vivo*. Os melhores resultados para a atividade antioxidante *in vitro* foram para as concentrações de concentrações de 100, 500 e 250 µg mL<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, bacuri, DNA, DPPH, *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais têm sido utilizadas, desde os tempos remotos, como medicamentos para o tratamento de uma série de doenças. O interesse em terapias naturais, principalmente em produtos de origem vegetal é muito comum na população mais carente, o exemplo é o uso da graxa das sementes de bacuri para tratamento de problemas de pele, tais como: queimaduras, feridas e até mesmo para tratamento de dores lombares e inflamações. No estado do Piauí, o fruto do bacuri é usado na fabricação de sucos, e das sementes, os nativos extraem uma graxa que ao ser aquecida se solubiliza e é usada para o tratamento de diversas doenças em humanos e animais. O uso dessa graxa sem um conhecimento prévio de suas propriedades mutagênica/antimutagênica ou antiinflamatória é preocupante por que não se conhece seu efeito e se faz necessário um estudo mais detalhado dessas propriedades farmacológicas que a população local conhece.

A graxa de bacuri, fabricada pela população a partir do óleo extraído das sementes é usada de forma sistemática principalmente como ação antiinflamatória. Outro fato relatado pela população com muita veemência é o seu uso para o tratamento de queimaduras. Em vista do seu grande uso popular, torna-se, portanto de grande interesse a pesquisa para a comprovação dos efeitos biológicos, dentre eles a sua ação sobre o estado redox celular bem como sobre a integridade da informação genômica, além da identificação dos constituintes químicos responsáveis por tais atividades.

O oxigênio é uma molécula altamente reativa que pode ser reduzido para formar agentes quimicamente reativos, estes agentes são as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que são moléculas que ocupam um orbital atômico ou molecular sozinho, sendo conhecida também como radicais livres. Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídios, ácidos graxos e as proteínas.

Todos os aeróbios apresentam uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, seqüestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (Maris *et al.*, 2001; Brozmanová *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2001). Os agentes oxidantes são formados no processo normal do metabolismo, mas em algumas condições patológicas, eles podem ser produzidos em excesso, levando ao estresse oxidativo e à possível morte celular.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) é um organismo eucarioto amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se refere às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (Costa e Ferreira, 2001). A avaliação da atividade antioxidante *in vivo* da graxa extraída da semente de bacuri foi realizada utilizando linhagens de *S. cerevisiae* mutadas em suas defesas antioxidantes, que nos permitiu perceber o percentual de ação antioxidante da graxa de bacuri frente a drogas oxidantes.

Os estudos *in vitro* da atividade antioxidante podem ser realizados através do ensaio espectrofotométrico de redução do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), frequentemente utilizado para determinar a capacidade de espécies vegetais na captura de radicais livres.

## 2. FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Platonia insignis* Mart.

A planta *Platonia insignis* Mart. pertencente à família Clusiaceae é popularmente chamada bacurizeiro, é uma espécie frutífera e madeireira, com centro de origem na Amazônia Oriental Brasileira, mais precisamente no Estado do Pará. Ocorre espontaneamente em todos os estados da Região Norte do Brasil e no Mato Grosso, Maranhão e Piauí. Assume importância econômica nos Estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Piauí, onde se concentram densas e diversificadas populações naturais, em áreas de vegetação secundária.

Existe pouca informação sobre a composição química de *Platonia insignis* Mart., sendo que os estudos existentes referem-se à composição da polpa do bacuri e sementes (Souza et al, 2000), não existindo informações sobre folhas.

O fruto do bacuri é muito apreciado na forma de suco, creme, sorvete, geléia, doce, pudim, tortas, iogurte, picolé e fermentados. O óleo das sementes é usado para fazer sabão, tratar doenças de pele e fazer remédios

cicatrizantes para ferimentos de animais. O látex amarelo da árvore em algumas regiões é utilizado para o tratamento de eczemas, vírus da herpes e outros problemas de pele (Shanley e Medina, 2005).

A análise fitoquímica dos compostos voláteis apresentou resultados positivos para álcoois terpênicos, entre eles, o mais abundante foi o linalol e compostos relacionados, furanóxidos e piranóxidos do linalol, hotrienol e diversos dimetil-octadiendiois e outros compostos glicosídicos (Boulanger *et al.* 1999).

O estudo fitoquímico das cascas das sementes de *Platonia insignis* Mart. indicam a presença dos seguintes compostos: ácidos (palmítico, oléico, linoleico,  $\alpha$ -linolênico, esteárico, caprílico e mirístico), álcoois (linalol,  $\alpha$ -terpineol e 3,7-dimetil-oct-1-en-3,7-diol), hidrocarbonetos e ésteres (Monteiro *et al.* 1997).



Figura 1- Bacuri: fruto da *Platonia insignis* Mart.

### 3. METODOLOGIA

A graxa das sementes é popularmente produzida a partir das sementes de *Platonia insignis* Mart. através da secagem das sementes, maceração, aquecimento e resfriamento. As amostras testadas foram obtidas no município de Barras – PI.

#### 3.1 Teste do disco central

As linhagens de leveduras (*S. cerevisiae*) foram crescidas em YEL até atingir a fase estacionária. Uma suspensão (100  $\mu$ L) contendo  $\pm 1 \times 10^7$  cel/mL foi tratada em eppendorfs com (100  $\mu$ L) de três concentrações diferentes da graxa da semente de bacuri (2 mg; 0,2 mg; 0,02 mg) por 2 horas em PBS. Foi avaliada a atividade antioxidante frente aos danos induzidos pelo  $H_2O_2$  (10 M). Para o controle negativo, foi acrescentado 100  $\mu$ L da linhagem e 900  $\mu$ L de PBS somente. Depois do tratamento estriou-se as linhagens em placas de petri com meio YEPD

Os genótipos das linhagens mutantes em defesas antioxidante para a enzima superóxido dismutase usadas no teste estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste estudo

Designação/Linhagens	Genótipo
EG103 (SOD-WT)	Mat $\alpha$ leu2-3 112 his3- $\Delta$ 1 trip1-289 ura3-52
EG118 ( <i>sod1</i> $\Delta$ )	Mesmo que EG103, exceto <i>sod1</i> :: URA3
EG118 ( <i>sod1</i> $\Delta$ )	Mesmo que EG103, exceto <i>sod2</i> :: TRP1
EG118 ( <i>sod1</i> $\Delta$ )	Mesmo que EG103, exceto <i>sod2</i> :: TRP1

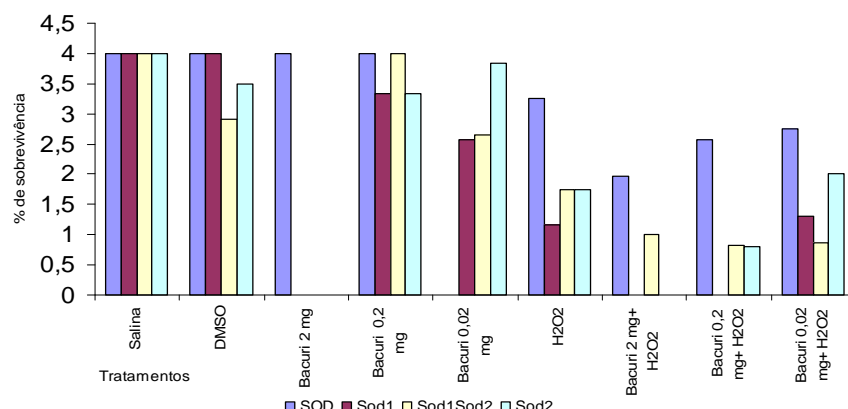
### 3.1.2 Avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>)

A avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup> foi realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical, na presença de substâncias antioxidantes (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A partir da solução estoque (1000 µg.mL<sup>-1</sup>) feita a partir do extrato da graxa e metanol foram realizadas diluições para a obtenção das concentrações finais de 500, 250 e 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Para tanto, alíquotas de 300 µL de soluções metanólicas dos extratos, em suas diferentes concentrações, foram adicionados em cubetas contendo solução metanólica 40 µM do radical (controle) (Coeficiente de Absorção Molar<sub>517nm</sub>: 11500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), com volume final de reação de 3,0 mL. A medida de absorbância iniciou imediatamente após a mistura das soluções. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg.mL<sup>-1</sup>), foram feitas a 517 nm, no primeiro, quinto e décimo minutos, e após esse período a cada 10 minutos até completar 1h para os extratos. A mistura de MeOH (2,7 mL) e extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco

Os dados experimentais da cinética de consumo de DPPH<sup>•</sup> na presença das amostras avaliadas foram ajustados para avaliar a quantidade total de compostos antioxidantes em extratos brutos (do consumo extrapolado a tempo infinito) e o percentual de compostos de alta e baixa reatividade presentes.

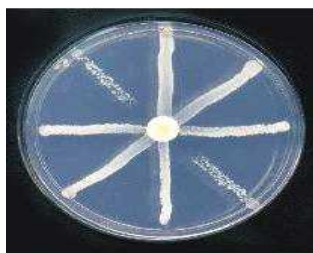
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A *S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos ao DNA, incluindo as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase e o reparo do DNA. Os percentuais de sobrevivências da *S. cerevisiae* apresentados na Figura 2 demonstram que a incubação das linhagens mutadas em defesas antioxidantes com a graxa não resulta em aumento de sobrevivência, frente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 M) pelo contrário apresentou efeito pró-oxidante.



**Figura 2. Efeitos da *Platonia insignis* Mart. na inibição de danos oxidativos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em linhagens mutadas de *S. cerevisiae***

As linhagens tiveram excelentes percentuais de sobrevivência em solução salina (Figura 3).



**Figura 3. Teste do disco central: Controle Negativo mostra a sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* em solução salina**

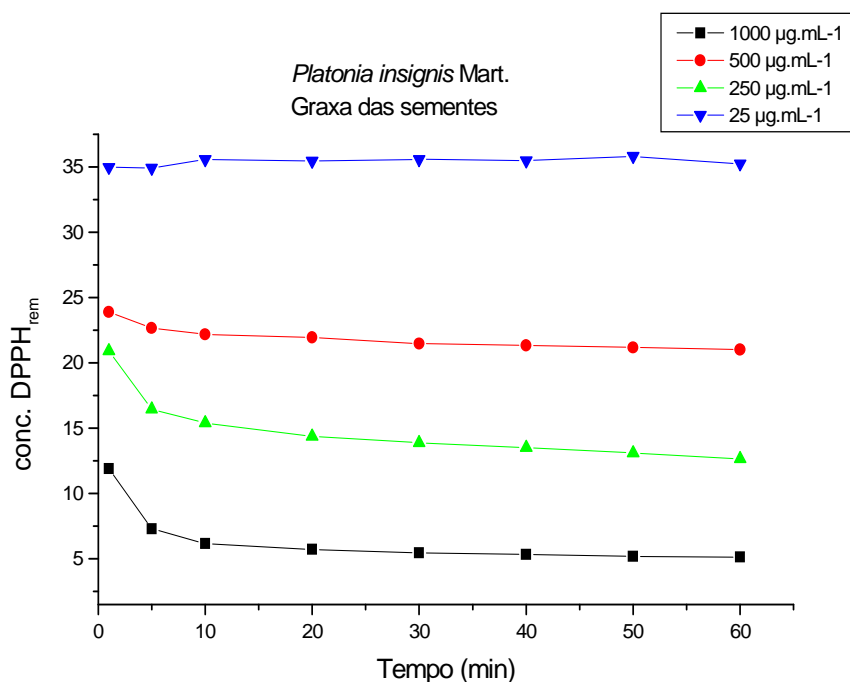
A ação citotóxica da graxa foi observada na concentração de 2 mg/mL. A graxa da *P. insignis* Mart. não inibe os danos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações testadas (Tabela 2). Os possíveis efeitos citotóxicos e pró-oxidantes sugerem a presença de compostos químicos naturais que devem ser quantificados e evidenciados para novas avaliações, em diferentes concentrações, de suas atividades biológicas visando futuras investigações farmacológicas.

**Tabela 2. Efeitos da graxa da *Platonia insignis* Mart. na inibição de danos oxidativos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae***

Tratamento	SOD (WT)	<i>Sod1Δ</i>	<i>Sod1ΔSod2Δ</i>	<i>Sod2Δ</i>
Salina (CN)	0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 M) CP	7,5 ± 2,5	28,3 ± 2,8	23,6 ± 1,1	23,6 ± 1,1
Pré-tratamento BS (2 mg)	0 ± 0,0	40,0 ± 0,0	40,0 ± 0,0	40,0 ± 0,0
Pré-tratamento BS (0, 2 mg)	0 ± 0,0	6,66 ± 3,8	0 ± 0,0	1,6 ± 1,4
Pré-tratamento BS (0,02 mg)	0 ± 0,0	17,9 ± 0,4	7,5 ± 0,0	2,5 ± 0,0
Pré-tratamento BS (2 mg) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20,3 ± 2,6*	40,0 ± 0,0*	33,3 ± 5,7*	40,0 ± 0,0*
Pré-tratamento BS (0, 2 mg) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14,1 ± 1,4*	40,0 ± 0,0*	31,6 ± 2,9*	32,0 ± 1,8*
Pré-tratamento BS (0,02 mg) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15,0 ± 0,0*	36,7 ± 5,7*	34,0 ± 0,0*	29,0 ± 1,0*
DMSO (solvente da BS)	0 ± 0,0	0 ± 0,0	7,8 0 ± 0,3	8,0 0 ± 0,0

Os valores da Tabela 2 representam a inibição do crescimento (mm). Valores da média ± SD (n=6). \* P < 0.05 nas condições de tratamento pela ANOVA e Dunnett t-tests

O comportamento cinético da reação do DPPH (40 µg.mL<sup>-1</sup>) com cada concentração (1000, 500, 250, 25 µg.mL<sup>-1</sup>) é mostrado na Figura 4, através na curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da concentração remanescente de DPPH (DPPH<sub>rem</sub>) em função do tempo (min). Observou-se que as amostras de concentração 1000 e 250 µg mL<sup>-1</sup> possuem tendência a apresentar cinética rápida (Sánchez-Moreno et al., 1998), atingindo 50% do consumo de DPPH logo nos primeiros minutos.



**Figura 4. Cinéticas de consumo do radical DPPH\* (Absorbância<sub>517nm</sub> em função do tempo de reação) ao agregar diferentes concentrações da graxa das sementes de *Platonia insignis* Mart.**

## 5. CONCLUSÃO

A graxa extraída das sementes de *P. insignis* Mart possui efeitos citotóxicos em pré-tratamento como em mutantes da *S. cerevisiae* defectivas na expressão da superóxido dismutase na concentração de 2 mg/mL e não inibe os danos oxidativos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo possíveis atividades pró-oxidantes nas concentrações testadas.

A graxa de *P. insignis* Mart. apresentou boa atividade antioxidante, medida através da capacidade de reação com o radical DPPH<sup>•</sup>. As amostras mais ativas foram nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg mL<sup>-1</sup>.

## 6. REFERÊNCIAS

BOULANGER, R., CHASSAGNE, D., CROUZET, J. **Free and bound flavour components of Amazonian fruits**. 1: Bacuri. J. Flavour Fragr, v. 14, p. 303-311, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BROZMANOVÁ, J., DUDAS, A., HENRIQUES, J.A.P. **Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk**. *Neoplasms*, v. 48, p. 85-93, 2001

COSTA, V., FERREIRA, P.M. **Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases**. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 22, p. 217-246, 2001.

HENRIQUES J.A.P., DAFRÉ A.L., PICADA J.N., MARIS A.F., SALVADOR M. **Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos**. In: SERAFINI L.A.

DE BARROS N.M., AZEVEDO J.L. (Eds.), **Biotecnologia na agricultura e na indústria**. Guaíba: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

HENRIQUES, J. A. P.; Saffi, J.; Ramos, A. L. P. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2006, 54, 7324-7330.

MARIS, A.F., ASSUMPÇÃO, A.L.K., BONATTO, D., BRENDDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. **Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria**. *Current Genetics*, v. 39, p. 137-149, 2001.

MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J. **Extraction of the soluble material from the shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO<sub>2</sub> and other solvents**. *Journal of Supercritical Fluids*, v.11, p.91-102, 1997.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA CALIXTO, F. **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols**. *Food Agric*, v. 76, p. 270-276, 1998.

SHANLEY, P., MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Pará: Belém. 2005, p. 54.

SOUZA, W.A. B., VASCOCELOS, L. F. L., ARAÚJO, E. C. E., ALVES, R. E. **Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)**. Jaboticabal, São Paulo: Funep, 2000.