

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

AVALIAÇÃO DA REPOSTA ANTIOXIDANTE MEDIADA PELO
EXTRATO DE *Platonia Insignis* EM CÉLULAS EXPOSTAS À
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Bolsista: Larissa Barbosa Borges

MANAUS – AM
JULHO – 2015

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

RELATÓRIO FINAL
PIBIC 2014
AVALIAÇÃO DA REPOSTA ANTIOXIDANTE MEDIADA PELO
EXTRATO DE *Platonia Insignis* EM CÉLULAS EXPOSTAS À
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Bolsista: Larissa Barbosa Borges
Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS – AM
JULHO – 2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, a 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 pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

MANAUS – AM
JULHO – 2015

RESUMO

A *Platonia insignis* é uma planta nativa da Amazônia de alto valor econômico e de larga utilização popular terapêutica. O óleo vegetal de suas sementes é utilizado para o tratamento de problemas de pele, tais como queimaduras e ferimentos e ainda, para o tratamento de dores lombares e inflamações dentre outras aplicações. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a reposta antioxidante mediada pelo extrato de *P. insignis* em células expostas à radiação ultravioleta, e ainda avaliou o seu potencial protetor, e também regenerador e citotóxico em queratinócitos submetidos à radiação UVA e UVB. Iniciaram-se os testes com a avaliação da citotoxicidade em queratinócitos tratados ou não com extrato hidroalcoólico do epicarpo (BVE) ou mesocarpo (BVM) do fruto de *P. insignis*. Após a verificação da citotoxicidade, procedeu-se os testes de indução de radiação UV para a determinação do potencial fotoprotetor e regenerativo do extrato. No teste para detecção da produção de ROS intracelular foi utilizado o composto fluorescente, 2'7'-dicloro-fluoresceína-di-acetato. No teste de viabilidade o extrato BVE não demonstrou nas concentrações de 5 a 100µg/mL diferentemente do BVM que em nas concentrações de 100 e 50 µg/mL obteve-se citotoxicidade significativa. No teste de exposição a radiação UVA os extratos BVE e BVM protegeram os queratinócitos nas concentrações de 25 µg/mL. No teste regenerativo extrato BVE demonstrou regeneração dos queratonócitos aumentando a viabilidade de 80 a 100 %. Já o extrato BVM em concentrações menores observou-se aproximadamente 80% de poder regenerativo. No ensaio antioxidante celular, o extrato BVM na concentração de 50 µg/mL demonstrou uma atividade antioxidante próxima de 40% quando analisado na concentração de 50 µg/mL. O extrato do mesocarpo de *P. insignis* apresentou pouco efeito citotóxico e significativo efeitos de proteção ultravioleta e antioxidante. Estes dados podem dar suporte para futuros trabalhos investigando melhor os efeitos e aplicações do fruto de *P. insignis* na formulação de produtos cosméticos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
OBJETIVO	10
METODOLOGIA.....	10
2. Exposição celular a Radiação Ultravioleta.....	11
2.1. Tratamento pré-irradiação.....	11
2.2. Tratamento pós- irradiação	11
3. Avaliação Da Atividade Antioxidante Celular (Dosagem De ROS).....	12
RESULTADOS	13
Viabilidade Celular.....	13
1. Exposição Celular à Radiação Ultravioleta	14
2.1. Tratamento pré-irradiação.....	14
1.2. Tratamento pós- irradiação	16
2. Atividade Antioxidante Celular	17
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), o câncer de pele é a segunda neoplasia maligna cutânea mais frequente, seja câncer não melanoma ou melanoma. Estima-se que a cada três casos de diagnóstico de câncer, um seja de pele e ainda que uma em cada cinco pessoas da América desenvolverá câncer de pele na vida. Essa alta incidência está relacionada aos fatores de risco associados aos continentes próximos dos trópicos como intensidade dos raios, condições climáticas e também hábitos individuais como tempo de exposição solar, frequência, característica dos tipos de pele e a utilização de produtos fotoprotetores (WHO, 2013).

A exposição da pele à radiação ultravioleta solar (UV), especialmente a sua radiação UVB (280-320 nm) devido às suas propriedades energéticas é pensado para ser a parte mais prejudicial da radiação UV e para induzir efeitos adversos sobre a pele humana. A radiação UVB induz danos incluindo inflamação (eritema ou queimaduras solares), pigmentação, hiperplasia, imunossupressão, fotoenvelhecimento cutâneo e câncer (FIGUEIREDO, 2014). A radiação UV é dividida em três bandas distintas em ordem decrescente de comprimento de onda e energia crescente: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (200-290 nm). Diferentes comprimentos de onda e energia associados com a radiação UV nessa subdivisão correspondem aos efeitos distintamente diferentes em tecidos vivos (LIU, H. et al, 2015). Tem sido demonstrado que UVB pode levar a vários estágios patológicos na pele, incluindo queimaduras solares, rugas, diminuição da imunidade contra infecções, envelhecimento prematuro e cancer.

Entre esses problemas causados pela radiação UV temos o estresse oxidativo que é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sistemas de defesa antioxidantes no corpo, onde o primeiro é sobreposto ao último. ROS são produzidos durante o metabolismo normal do oxigênio e stress ambiental (YOO, H. G. et al., 2014). Com isso, vários estudos têm sido realizados na busca de novos filtros naturais, onde se relaciona a capacidade de absorvência na região UV com possível atividade fotoprotetora.

Dando continuidade a pesquisa iniciada em 2013 que tinha por objetivo avaliar o potencial fotoprotetor, este projeto segue dentro dessa linha, com o objetivo de se aprofundar no mecanismo dessa atividade fotoprotetora mediada pelo extrato, buscando elucidar algumas vias e respostas antioxidantes de células expostas à radiação UV observando também, um possível efeito regenerador deste extrato do bacuri- *Platonia insignis*. Desta forma, este

projeto nos fornece uma alternativa interessante para a produção um bioativo cosmético natural da região amazônica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A *Platonia insignis* é uma árvore nativa da Amazônia e das Guianas de alto valor econômico, que tem como principal consumidor e produtor o estado do Pará. Sua madeira, bastante resistente, é utilizada em construções e na fabricação de móveis e seus frutos são utilizados na culinária na forma de sorvetes, licores, tortas, geleias, dentre outros produtos (SHANLEY e MEDINA, 2005).

Proveniente da família Clusiaceae, a árvore de *P. insignis* pode atingir aproximadamente 35 m de altura e 1 m de diâmetro. Suas folhas são grandes, rígidas e brilhantes; sua flor é de cor vermelha, rosa ou branca e seu fruto é oval, do tipo baga, de peso entre 200g e 1 kg, com casca espessa, cor amarelada e polpa branco-cremosa (SOUZA, 2000; CHITARRA e CHITARRA, 2005). Este fruto é conhecido popularmente como Bacuri e possui sabor ácido, adocicado e odor agradável tendo sido relatado algumas vezes na literatura e na história, como quando o Marquês do Pombal (1699-1782) ao escrever um enorme tratado sobre a região amazônica cita-o como um valioso fruto: “A fruta bacuri, posto que tenha seus senões, também merece sua menção, pelo seu excelente gosto. A sua árvore é famosa de grande, e também o fruto é de bom tamanho” (VIEIRA, 2011).

O fruto Bacuri é rico em fósforo, cálcio, ferro e vitamina C (SOUSA, 2011), A casca do bacurizeiro fruta são caracterizados como um produto sem exploração. No entanto, alguns metabolitos secundários foram identificados como 1-terpinol e b-bisaboleno, e os componentes isolados foram predominantemente ácidos gordos livres: palmítico, oleico, linoleico, linolênico, um esteárico e ácidos. Em adição a estes ácidos gordos, os extratos LCO₂-EtOH continha ácidos caprílico e mirístico, álcoois (linalol e 3,7-dimetiloct-1-en-3,7-diol), e o éter de fenol , que notavelmente aumentada seu valor devido ao grande fonte de compostos que comportam várias propriedades biológicas (MENDES, M. B. et al., 2014). E é utilizado na medicina popular em produtos de finalidade digestiva, diurética e cicatrizante. O óleo vegetal de suas sementes é utilizado para o tratamento de problemas de pele, tais como queimaduras e feridas e ainda, para o tratamento de dores lombares e inflamações. O emplasto

da seiva da sua árvore é aplicado no tratamento de eczemas, herpes e outras doenças cutâneas (SHANLEY e MEDINA, 2005), e estudos preliminares observaram que esta espécie tem significativo potencial antioxidante e citotóxico (LIMA et al, 2007).

As alterações bioquímicas, moleculares e histológicas induzidas por exposição UVB pele aguda pode levar ao estresse oxidativo, inflamação, imunossupressão, fotoenvelhecimento, e carcinogêneas (FIGUEIREDO, 2014). Por conseguinte, para proteger a pele contra danos da luz solar o uso de roupas e óculos de sol apropriado em conjunção com o uso diário de filtros solares composto por uma mistura de filtros UV orgânicos e inorgânicos são recomendado se lesões pré-neoplásicas, tem se evidenciado cada dia mais, sendo estas ultimas os de maior preocupação atual. Estima-se que a cada três casos de diagnóstico de câncer, um seja de pele e ainda que uma em cada cinco pessoas da América desenvolverá câncer de pele na vida (WHO, 2013). Essa alta incidência está relacionada aos fatores de risco associados aos continentes próximos dos trópicos como intensidade dos raios, condições climáticas e também hábitos individuais como tempo de exposição solar, frequência, característica dos tipos de pele e a utilização de produtos fotoprotetores ou filtros solares (WHO, 2013).

Os filtros solares são moléculas ou partículas capazes de interagir com a radiação ultravioleta incidente sobre a pele, refletindo, dispersando ou absorvendo a radiação ultravioleta e, dessa forma, reduzindo sua interação com a superfície cutânea. Eles são divididos em dois grandes grupos, conforme sua origem, filtros químicos (naturais ou sintéticos) e filtros físicos (filtros inorgânicos).

Os filtros físicos são partículas de origem mineral capazes de refletir ou dispersar a luz ultravioleta que incide sobre a superfície cutânea, reduzindo a quantidade de energia que é absorvida pela pele e, dessa forma, minimizando seus efeitos prejudiciais. Dentre os filtros inorgânicos, os mais utilizados são o dióxido de titânio e o óxido de zinco (SHAAT, 2005).

Os filtros químicos, por outro lado, são moléculas capazes de absorver a radiação ultravioleta e, desta maneira, reduzir a ação desta sobre o tecido cutâneo. São divididos em filtros absorvedores de UVB, absorvedores de UVA e, mais recentemente, filtros de amplo espectro, absorvendo nos dois comprimentos de onda (UVA e UVB). (HERZOG, 2005)

Os produtos fotoprotetores são atualmente uma forma eficaz de prevenção contra o câncer de pele (RAI, 2007). Estes produtos estão cada dia mais associados a uma nova tendência do mercado mundial de incorporar ativos naturais em insumos farmacêuticos e cosméticos, devido aos resultados inovadores do grande número de pesquisa na área de produtos naturais (AMER, 2009). Dessa maneira, as concentrações individuais necessárias de cada filtro são reduzidas e, por consequência, eventuais efeitos adversos além da ação sinérgica de alguns

filtros combinados, potencializando a ação fotoprotetora e tornando o produto final mais seguro.

Dentre os filtros químicos, foi observado que os filtros naturais em comparação com os sintéticos apresentam grandes vantagens quanto aos efeitos colaterais e maior segurança ao meio ambiente na sua fabricação (AMER, 2009), assim como grande parte dos produtos com ativos naturais. Com isso, vários estudos têm sido realizados na busca de novos filtros naturais, onde se relaciona a capacidade de absorbância na região UV com possível atividade fotoprotetora. Como exemplo, o estudo preliminar realizado com as espécies *de Hamamelis virginiana*, *Rhamnus purshiana* e *Cinnamomum zeylanicum* que apresentaram atividade potencializadora do fator de proteção solar (FPS) (RAMOS et al., 1996.)

Em estudos realizados com *Peumus boldus* que revelaram atividade fotoprotetora da boldina, substância encontrado nessa espécie, contra raios UVB *in vitro* e *in vivo* (HIDALGO, 1998) e mais recentemente, investigações dessas propriedades nesta mesma espécie, *Garcinia brasiliensis* também da família Clusiaceae, que o extrato tem um grande potencial para ser usado como um filtro solar, o que sugere que pode ser incorporado em formulações além de filtros UV sintéticas contribuem para a redução de filtros sintéticos em suas formulações (FIGUEIREDO, 2014).

Muitas dessas espécies que absorvem na região ultravioleta apresentam moléculas ativas semelhantes a dos filtros químicos sintéticos. Essas moléculas são geralmente compostos pertencentes a classe dos flavonóides, taninos, antraquinonas e alcalóides. Tendo sido essas classes relacionadas na literatura, a essa propriedade de alta absorbância e atividade antioxidantes e possivelmente fotoprotetora (BOBIN, 1994; HENRIQUES, 2000; ZUANAZI, 2000; GOOSSENS & LEPOITTEVIN, 2003).

OBJETIVO

Geral:

- Avaliar a resposta antioxidante mediada pelo extrato de *Platonia insignis* em células expostas à radiação ultravioleta.

Específicos:

- Avaliar a citotoxicidade celular em queratinócitos tratados com extrato de *Platonia Insignis*.
- Avaliar o potencial de fotoproteção induzido pela radiação UV em queratinócitos tratados pelo extrato de *Platonia Insignis*.
- Avaliar o efeito regenerador do extrato de *Platonia insignis* sobre a resposta antioxidante dos queratinócitos expostos à radiação UV.
- Avaliar o efeito protetor do extrato de *Platonia insignis* sobre a resposta antioxidante dos queratinócitos expostos à radiação UV.

METODOLOGIA

1. Determinação de Viabilidade Celular (Alamar Blue)

Queratinócitos da linhagem HaCat (5×10^3 céls/poços) foram dispostos em placas de 96 poços e expostas a concentrações de 1,25 a 100ug/mL juntamente com doxorrubicina (ug/mL), utilizada como controle positivo de morte.

A placa foi incubada por 24h com o extrato hidroalcoólico de *P. insignis* de diferentes partes do fruto, epicarpo BVE e mesocarpo -BVM nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL, 10µg/mL e 5µg/mL e após a incubação, 10uL da solução de Alamar Blue foram adicionadas as células e em seguida, incubadas por 2 horas a 37°C. A fluorescência foi mensurada em

leitor de microplacas usando uma excitação a 545nm e emissão a 595nm e expressa com porcentagem de células em relação ao controle negativo.

2. Exposição celular a Radiação Ultravioleta

2.1. Tratamento pré-irradiação

O ensaio foi realizado segundo Silva e colaboradores (2013) com adaptações. Brevemente, foram preparadas duas placas da linhagem celular de queratinócitos da linhagem HaCat na concentração de 6×10^3 cels/ 100 μ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as placas foram lavadas com tampão HBSS previamente aquecido. Foi adicionado 100 μ L de HBSS/poço nas placas e o extrato em diferentes concentrações (1,25 a 100 μ g/mL). Em seguida, as placas foram tratadas em diferentes concentrações do extrato diluído em DMEM suplementado com SFB e novamente incubadas por 2h a 37°C e 5% de CO₂. Após tratamento, uma placa foi exposta a 10 J/cm² de radiação UVB e UVA sendo o controle indicado pelo UV (+) enquanto a outra placa foi protegida da radiação UV, UV (-) durante 30 minutos a 1 hora ou radiação suficiente para produzir aproximadamente 50% de viabilidade. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão HBSS para a retirada dos resíduos do extrato. O tampão foi substituído por DMEM suplementado com SFB e as placas incubadas por mais 24h. As placas foram centrifugadas a 800rpm por 5min., o meio foi retirado por inversão e 100 μ L de DMSO/poço foi adicionada. Em seguida as amostras foram submetidas ao teste de viabilidade celular como descrito no item 1.

2.2. Tratamento pós- irradiação

O ensaio foi realizado segundo Silva e colaboradores (2013) com adaptações. Brevemente, foram preparadas duas placas da linhagem celular de queratinócitos da linhagem

HaCat na concentração de 6×10^3 cels/ 100 μ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as placas foram lavadas com tampão HBSS previamente aquecido. Foi adicionado 100 μ L de HBSS/poço nas placas. Enquanto uma placa foi protegida da luz (UVA-), a outra foi exposta a 10 J/cm² de radiação UVA (UVA+). Em seguida, as placas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato diluído em DMSO e DMEM suplementado com SFB e incubadas por 2h a 37° C e 5% de CO₂. As placas foram lavadas com tampão HBSS para a retirada dos resíduos do extrato. O tampão foi substituído por DMEM suplementado com SFB e as placas incubadas por mais 24 h. As placas foram centrifugadas a 800rpm por 5 min., o meio foi retirado por inversão e 100 μ L de DMSO/poço foi adicionado. Em seguida as amostras foram submetidas ao teste de viabilidade celular como descrito no item 5.3.

3. Avaliação Da Atividade Antioxidante Celular (Dosagem De ROS)

A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada utilizando a metodologia descrita por Wolfe e Liu (2007) que se baseia na detecção da produção de ROS intracelular utilizando o composto fluorescente: 2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Nesta técnica, queratinócitos humanos da linhagem HaCat foram semeados em 100 μ L de meio de crescimento e incubados por 24h. Depois o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS. Em seguida, 100 μ L de uma solução a 10 μ M de DCFH-DA dissolvido em tampão de Hank, foram adicionados aos poços e incubados durante 30 minutos a 37°C e 5% CO₂ e as células foram expostas aos raios UVA. Em seguida o extrato de *P.insignis* foi adicionado em duas concentrações e a sua fluorescência foi mensurada imediatamente no comprimento de onda de excitação 485nm e de emissão 520nm durante 60 minutos em intervalos de 5 min. Os controles com e sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos e a quercetina foi utilizada como controle positivo da atividade antioxidante.

RESULTADOS

Viabilidade Celular

O efeito sobre a viabilidade celular do extrato BVE na célula HaCat utilizando o ensaio do Alamar Blue, estão representados na figura 1, onde, a partir das concentrações de 100 μ g/ mL, 50 μ g/ mL, 25 μ g/ mL, 5 μ g/ mL que foram testadas, as células HaCat apresentaram viabilidade maior que 100%.

No entanto, as células tratadas com o extrato de BVM nas concentrações de 100 μ g/mL e 50 μ g/mL apresentaram viabilidade menor do que as tratadas nas demais concentrações (figura 2). Tendo em vista esse resultado, escolheram-se as concentrações de 6,25 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL para a realização dos demais ensaios, pois o extrato de BVM nessas concentrações não apresentou potencial citotóxico significativo.

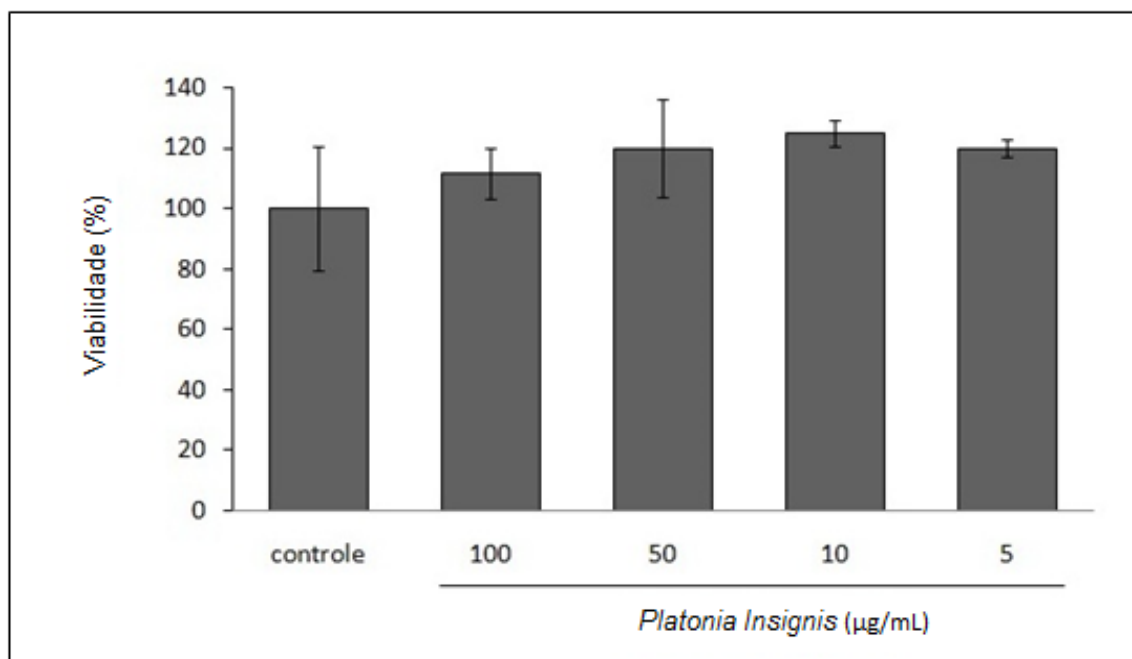


Figura 1 – Viabilidade celular de queratinócitos HaCat incubados com o extrato BVE por 24h mensurada pelo ensaio do Alamar blue.

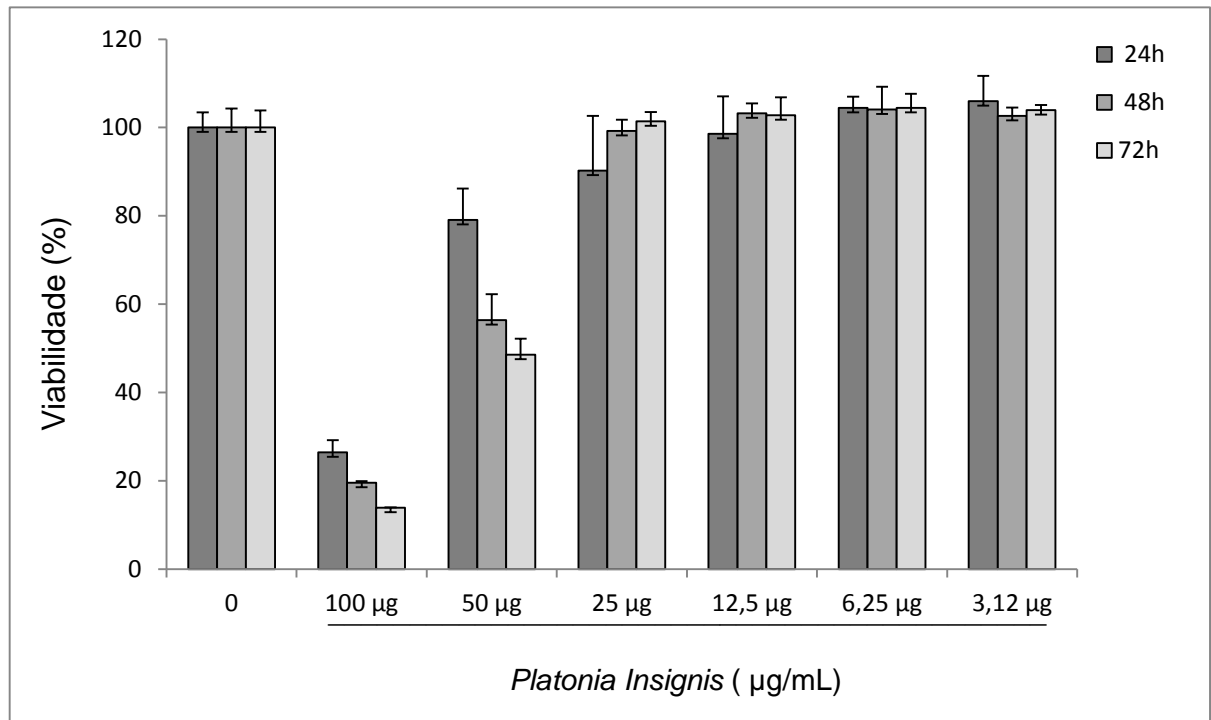


Figura 2 - Viabilidade celular de queratinócitos HaCat incubados com o extrato BVM por 24h, 48h, 72h mensurada pelo ensaio do Alamar blue.

1. Exposição Celular à Radiação Ultravioleta

2.1. Tratamento pré-irradiação

Os queratinócitos da linhagem HaCat, que não foram expostos a radiação UVA porém submetidos ao tratamento com os extratos BVE na concentração de 25µg/mL e BVM na concentração de 25µg/mL, apresentaram viabilidade celular de **122,41%** e **114,11%**, respectivamente.

Ao serem submetidos ao tratamento com os extratos BVE e BVM e expostos à irradiação UVA por 5 minutos, apresentaram viabilidade celular de **116,73%** e **155,46%**, respectivamente conforme se observa na figura 3.

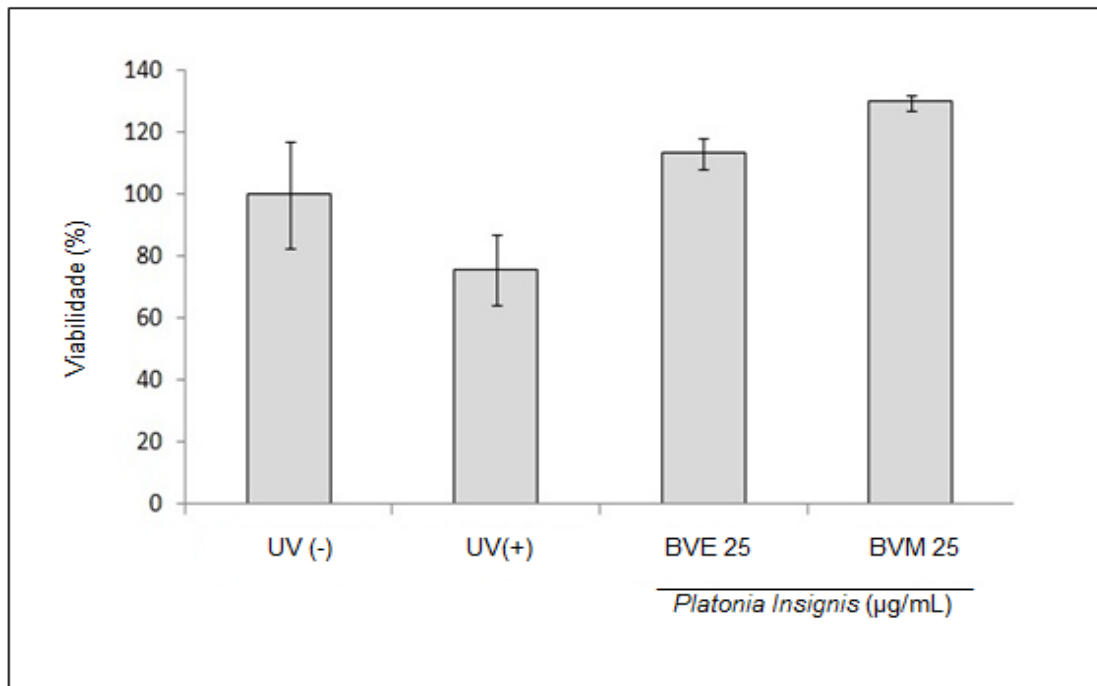


Figura 3 – Viabilidade celular de queratinócitos tratados com os extratos de *Platonia Insignis* e depois expostos a 5 min de irradiação UVA.

O ensaio foi refeito para o extrato BVM nas concentrações de 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL e 6,25 μ g/mL. Na figura 4 observamos que as células expostas à radiação UVB com tratamento, demonstraram viabilidade em proporções próximas nas concentrações de 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL.

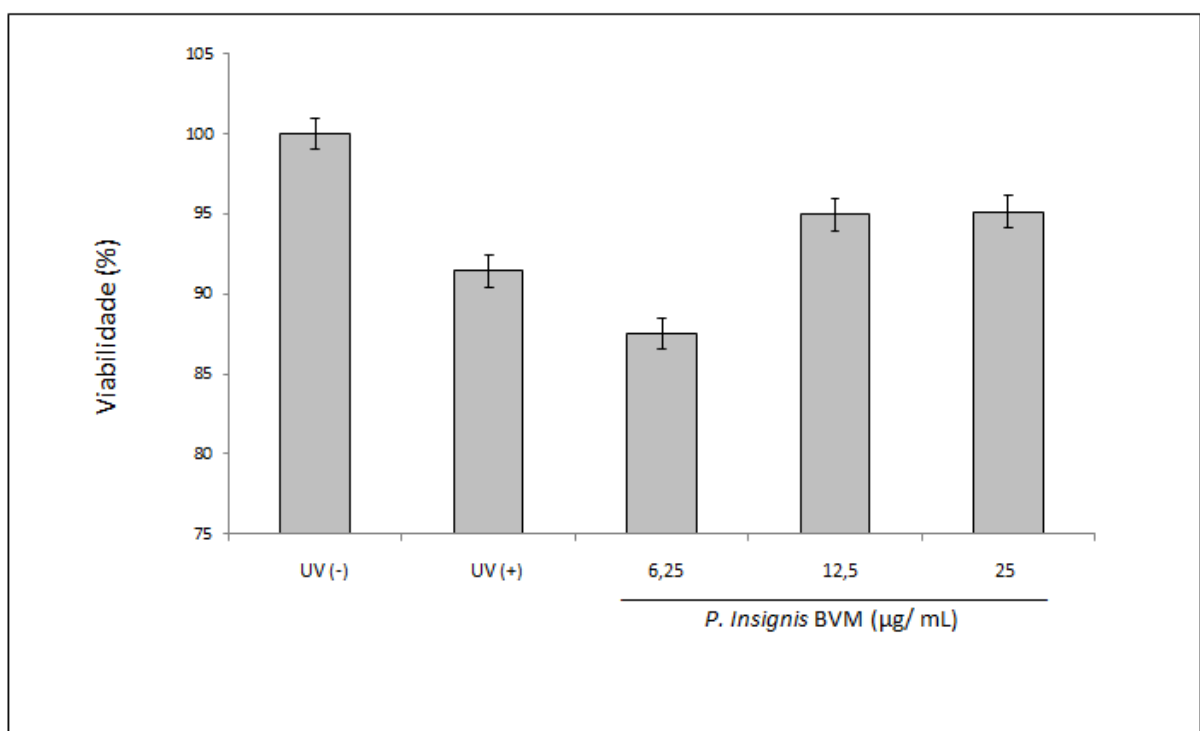


Figura 4 - Viabilidade celular de queratinócitos tratados com o extrato BVM de *Platonia Insignis* e depois expostos às 1h de irradiação UVB.

1.2. Tratamento pós- radiação

O resultado foi avaliado a partir da leitura do Alamar Blue para verificar a viabilidade das células tratadas com o agente regenerativo após a exposição aos raios UVA. Foi considerada como controle negativo (UV-) as células não expostas com 100% de viabilidade e como controle positivo (UV+) as células que foram expostas aos raios UVA.

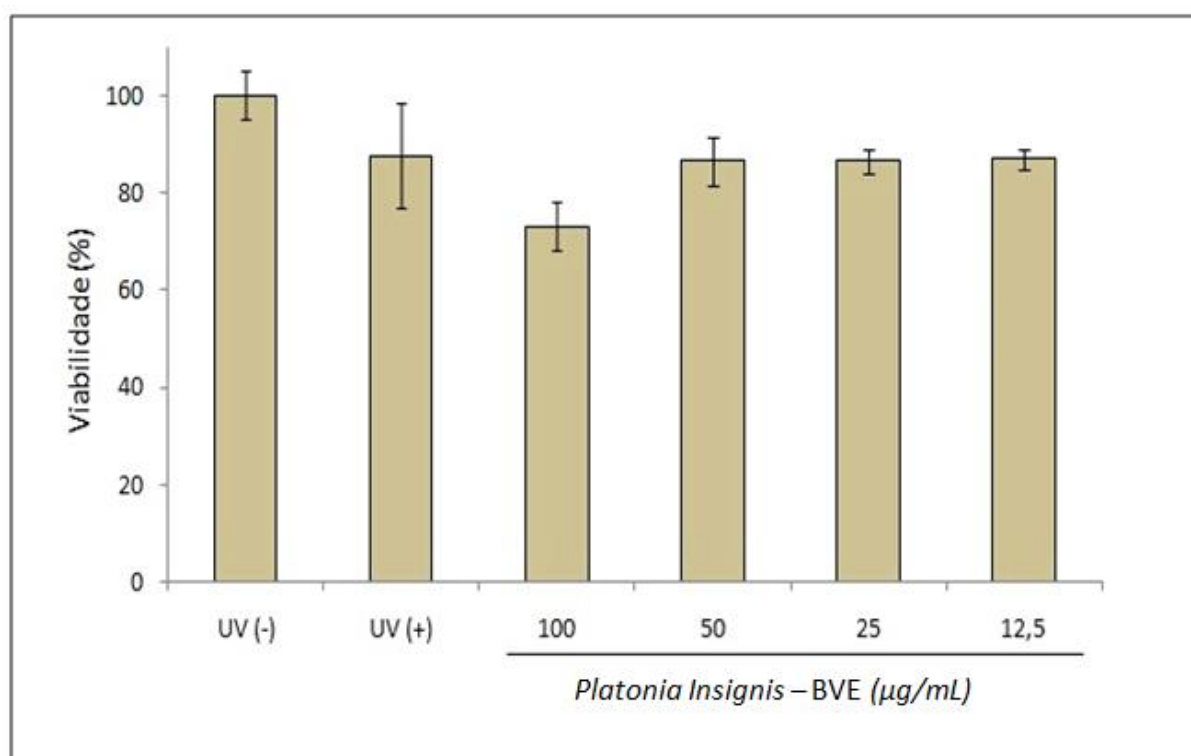


Figura 6 – Viabilidade celular de queratinócitos expostos a radiação UVA e posteriormente tratados com os extratos de *P.Insignis* BVE.

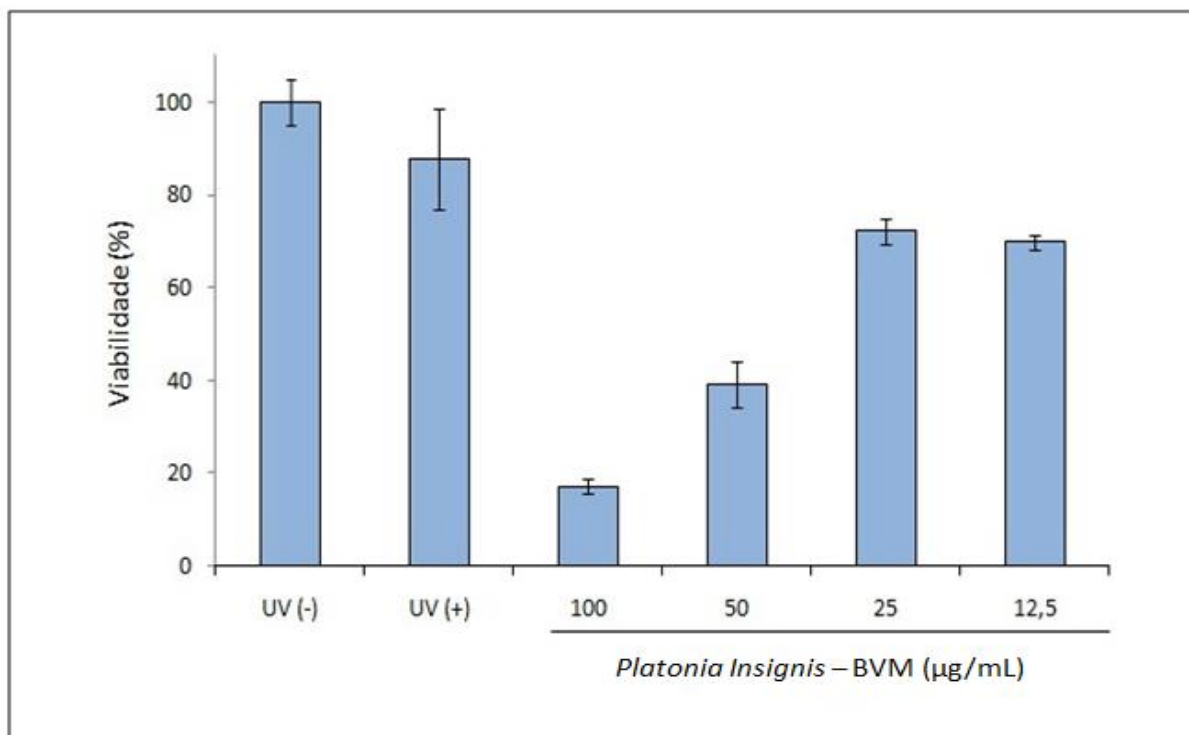


Figura 7 – Viabilidade celular de queratinócitos expostos à irradiação UVA e posteriormente tratados com os extratos de *P.Insignis* BVM.

Após o tratamento com os extratos nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL e 12,5µg/mL observou-se dois diferentes perfis de recuperação tecidual. O extrato BVE, conforme figura 4, uma viabilidade entre 80 e 100% após o seu tratamento. Já o extrato BVM em concentrações menores observa-se aproximadamente 80% de células viáveis conforme o figura 5.

2. Atividade Antioxidante Celular

Apesar de não ter sido proposto no projeto, esse teste direciona o perfil antioxidante intracelular da espécie sendo também um dos marcadores de estresse oxidativo uma vez que os ROS são espécies reativas a oxigênio (Reactive Oxygen Species).

Foi utilizado como fator promotor de estresse oxidativo a luz UVA e as concentrações testadas dos extratos tanto de BVE quanto de BVM foram de 50 e 25 µg/mL, e a quercetina, flavonóide utilizado como antioxidante padrão, nas concentrações de 5 e 2,5 µg/mL

Conforme o Figura 6, observa-se que o marcador mais elevado, representado pelo controle UVA (+), indica a produção de ROS mediante exposição à luz UVA sem nenhum tipo de proteção. Nos próximos marcadores, observa-se que as células que foram tratadas com o extrato BVE e BVM, nas concentrações supracitadas, apresentaram um perfil de redução da produção de ROS intracelular similar ao padrão utilizado para esse teste.

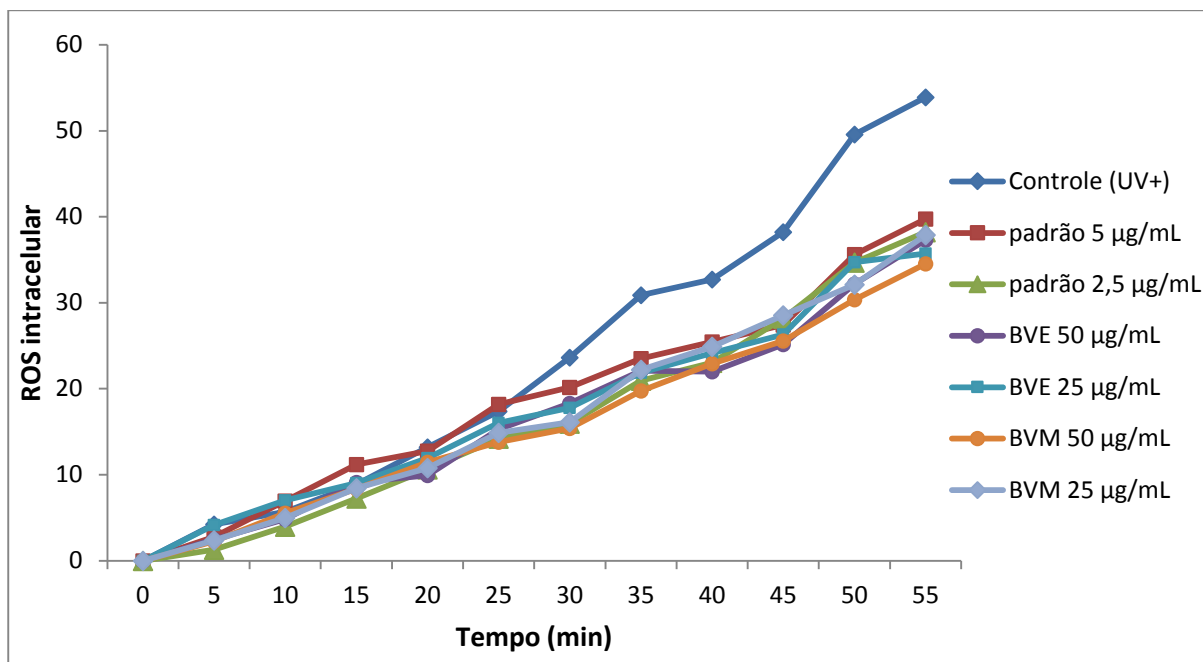


Figura 8 – Dosagem de ROS intracelular em queratinócitos tratados com os extratos BVE e BVM.

Neste método, a atividade antioxidante dos extratos é estabelecida em porcentagem e calculada a partir do potencial de redução do ROS intracelular ao longo de 1 hora, em intervalos de 5 em 5 min. Baseado nisso a figura 7, apresenta um comparativo entre o padrão, o extrato BVE e o BVM, onde destaca-se o extrato BVM na concentração de 50 µg/mL que demonstrou uma atividade próxima de 40%.

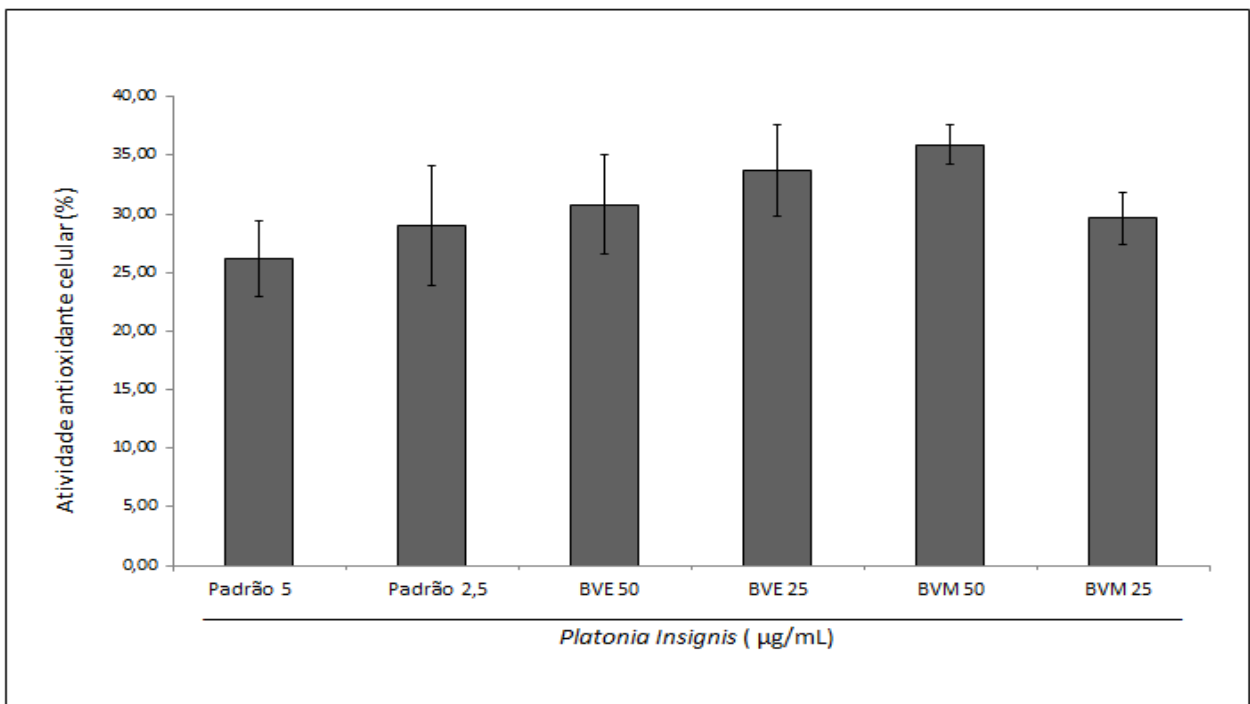


Figura 9 – Percentual de atividade antioxidante intracelular do extrato BVE e BVM.

DISCUSSÃO

Neste trabalho Buscou-se testar novos extratos com agentes bioativo naturais que pudessem nos proteger das radiações UVB e UVA sendo esses extratos epicarpo (BVE) e mesocarpo (BVM) de diferentes camadas do fruto Bacuri-*Platonía Insignis*, esse foi um trabalho inédito com essa planta então buscou-se referências de testes feitos com plantas da mesma família do Bacuri para que pudéssemos comparar nossos resultados. Os extratos BVE e BVM que foram testados em células da pele HaCat com fim de avaliar o seu potencial citotóxico pelo método de ensaio Alamar Blue, a partir desse ensaio foram analisados os resultados mostrados primeiramente na figura 1 na qual pode-se observar que o extrato de BVE não apresentou atividade citotóxica nas células HaCat em nenhuma das concentrações testadas visto que as células apresentaram um elevado índice de viabilidade.

No entanto na figura 2 onde pode-se analisar o extrato BVM nas baixas concentrações de 3,12µg/mL, 6,25µg/mL, 12,5µg/m e 25µg/mL obteve-se viabilidade de ate 100% nos ensaios de 24h, 48h e 72h já nas concentrações de, 50 µg/mL e 100µg/mL obteve-se um resultado de viabilidade reduzida de 80% e 27% respectivamente demonstrando potencial citotóxico do extrato apresentando alta letalidade.

Ao se comparar com ensaios realizados por Oliveira (2014) no ensaio com o extrato de *Calophyllum brasiliense* da mesma família do extrato utilizado nesse trabalho obteve os seguintes resultados: as células tratadas com extrato apresentaram em porcentagem de viabilidade com o teste Alamar Blue, $IC_{50} = 119,94 \pm 4,31 \mu\text{g/mL}$ após um teste de citotoxicidade de 24 h, usando células CHO-K1, que mostra baixa citotoxicidade. No entanto, quando as células foram expostas ao extrato durante 72h, o valor de IC_{50} foi de $8,39 \pm 2,00 \mu\text{g/mL}$, mostrando neste caso, um efeito citotóxico pronunciado, resultados estes similares aos encontrados no presente estudo.

No ensaio onde as células HaCat foram expostas a radiação UV utilizando-se no ensaio as duas radiações UVA e UVB sendo mais utilizada a radiação UVA por tal lâmpada da tal ter sido adquirida no início dos ensaios produzidos nesse trabalho e posteriormente foi adquirida a lâmpada de radiação UVB sendo assim refez-se apenas alguns dos ensaios por falta de tempo para o fim do projeto. Os queratinócitos da linhagem HaCat, que não foram expostos a radiação UVA porém submetidos ao tratamento com os extratos BVE e BVM na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ cada apresentaram viabilidade celular de 122,41% e 114,11%, respectivamente e quando expostas por 5 min de radiação UVA com os extratos na mesma concentração anterior citada apresentaram viabilidade celular de 116,73% e 155,46% demonstrando a proteção do extrato por não haver morte celular e uma possível presença de agentes fluorescentes no extrato por ser medida a viabilidade pelo método do Alamar blue o qual é um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) (RIBEIRO, 2004) ou ter induzido o crescimento celular.

Em comparação, o artigo de Chiang et. al (2013), demonstra com o extrato de *Neonauclea reticulata*, que as preparações a uma concentração elevada ($100 \mu\text{g/mL}$) estimularam o crescimento de queratinócitos (150%). Para comprovar a evidencia dos compostos fluorescentes no extrato estudado nesse estudo poderíamos ter feito um teste em uma placa de 6 poços apenas com o extrato e ter medido sua fluorescência pelo método do Alamar Blue porém por falta de tempo tal teste não pode ser realizado.

O ensaio de radiação UVB foi refeito para o extrato BVM com exposição de 1 hora visto que suas concentrações para a viabilidade das células Hacat tiveram grande diferença em relação ao extrato BVE. De acordo com o resultado do ensaio o extrato BVM mostrou baixa proteção para as células nas concentrações de $12,5 \mu\text{g/mL}$ e $25 \mu\text{g/mL}$ com 94% e 95% de viabilidade em relação ao controle de UV (+) com 91% de viabilidade, levando em conta que na concentração de $6,12 \mu\text{g/mL}$ houve morte de 87% das células pela radiação UVB

por ser a mais baixa concentração utilizada no ensaio não protegendo as células. Utilizando como referências os resultados obtidos por Oliveira (2014), onde o ensaio de potencial fotoprotector utilizado para avaliar a capacidade de absorção por radiação UVB do extrato de *C. Brasiliense* nas concentrações de 10mg/mL, 50 mg/ml e 100mg/mL o extrato absorveu a radiação UVB e protegeu a viabilidade das células de fibroblastos de 16,3% e 20,1% , respectivamente, em relação ao controle irradiado. Resultados similares ao encontrado no presente estudo.

O ensaio de tratamento pós-irradiação onde se mediu a capacidade regenerativa das células induzidas pelo extrato observou-se dois diferentes perfis de recuperação. O extrato BVE, apresentou maior potencial regenerativo uma vez que as células apresentaram uma viabilidade entre 80% e 100% após o seu tratamento, assemelhando-se ao padrão de regeneração utilizado. Já o extrato BVM nas concentrações mais altas não apresentou uma viabilidade tão alta, provavelmente decorrente da toxicidade celular apresentada nessas concentrações, no entanto em concentrações menores observa-se aproximadamente 80% de células viáveis. De acordo com Yamaguchi (2014), o bacuri apresenta-se como uma fonte de substâncias bioativas presentes em todas as partes do fruto. Na composição química estão presentes substâncias graxas, diterpenos, xantonas e triglicerídeos como os principais constituintes podendo ajudar na regeneração celular.

A inflamação induzida pela radiação UVB e a acumulação resultante de espécies reativas ao oxigênio-ROS desempenham um papel importante no envelhecimento da pele. Estudos têm mostrado que a geração de ROS intracelular, tais como o ânion superóxido (O₂⁻), Radical hidroxila (OH), oxigênio (1O₂), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), levam a um estado de estresse oxidativo celular e a referida geração de ROS é um mediador chave no processo de fotoenvelhecimento (CHIANG, 2013).

No método, a atividade antioxidante dos extratos foi estabelecido um comparativo entre o padrão, o extrato BVE e o BVM, onde destaca-se o extrato BVM na concentração de 50 µg/mL que demonstrou uma atividade próxima de 40% na ação contra a expressão de ROS comparado com o controle sem tratamento.

Em comparação com os resultados expostos por YOO, H. G. et al., (2014), que demonstra viabilidade de até 100% dos queratinócitos epidérmicos humanos normais expostos ao UVB com concentrações de 40 a 25 mg/L do extrato que comprovam a ação antioxidante do extrato de *Lithospermum erythrorhizon*-LE. Estes resultados sugerem que o extrato LE fenólico contém potentes antioxidantes intracelulares que podem proteger as células contra o estresse oxidativo. Assim como dados publicados anteriormente sobre a

Platonia insignis que possui agentes antioxidantes como demonstrados nos seguintes artigos: Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models (COSTA JÚNIOR et al., 2011) e Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*) (YAMAGUCHI et al., 2014), os quais citam as propriedades antioxidantes da *Platonia Insignis*.

CONCLUSÃO

Os extratos de diferentes camadas do fruto de *Platonia Insignis* apresentaram resultados diferentes, o extrato do epicarpo possivelmente não apresenta substâncias potencialmente citotóxicas devido a sua baixa letalidade diferentemente do extrato do mesocarpo que demonstrou citotoxicidade em altas concentrações.

Nos resultados dos testes de radiação UVA nas células tratadas com o extrato do mesocarpo da *Platonia Insignis* pode-se observar que o extrato protegeu as células durante a radiação UV demonstrando seu potencial de fotoproteção. Com o extrato do epicarpo houve letalidade das células.

O extrato do epicarpo da *Platonia Insignis* no teste de tratamento pós radiação demonstrou significativo poder de regeneração pela alta viabilidade das células tratadas. Já o extrato do mesocarpo apresentou significativa letalidade nas células.

Houve a inibição de produção de espécies reativas ao oxigênio em células expostas a radiação UV e aos extratos do epicarpo e mesocarpo de *Platonia Insignis*. Ambos demonstraram ação antioxidante podendo prevenir o estresse oxidativo e o fotoenvelhecimento.

Estes dados podem dar suporte para futuros trabalhos investigando melhor os efeitos e aplicações do fruto de *P. insignis* na formulação de produtos cosméticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. Sistemática de angiospermas no Brasil. Viçosa, MG: UFV, ed. 2, v. 1, p.309, 2002.

CHIANG, H. M. et al. Neonauclea reticulata (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after uvb exposure via Ros scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway. Hindawi Publishing Corporation, v.2013, p.9, 2013.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: Esal: Faepe, p. 289, 1990.

COSTA JÚNIOR J.S.C, SILVA D.C, ANDRADE A., CAVALCANTE A.C.M, CITÓ A.M.G.L., NETO J.M.M., SAFFI J. Efeitos da banha extraída da semente da *Platonia insignis* Mart. em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Anais da 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2007;

COSTA JÚNIOR J.S., ALMEIDA A.A.C, TOMÉ A. R, CITÓ A.M.G.L., FREITAS R.M, SAFFI J. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. *Epilepsy & Behavior* 22, 2011.

FERREIRA, A. G. Dicionário de latim-português. Lisboa: Porto Editora, 1998.

FONSECA, E. T. da. Frutas do Brasil. Rio de Janeiro: MEC/Instituto Nacional do Livro, p. 281, 1954.

GOOSSENS, A.; LEPOITTEVIN, J.P. Allergie de contact aux cosmétiques et aux composants de parfums: aspects cliniques, chimiques et diagnostiques nouveaux. *Revue Française D'allergologie et D'immunologie Clinique*, n. 43, p. 294-300, 2003.

J. K. LEE et al.; In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicology in Vitro* ed.14, p. 345-349, 2000.

JÚNIOR, J. S. D. C. et al. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. *Epilepsy & behavior* : E&B, v. 22, n. 4, p. 678–84, dez. 2011.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A., MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspetos básicos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, ed. 2, p. 641-642, 2000.

HIDALGO, M.E.; GONZALEZ, I.; TORO, F.; FERNÁNDEZ, E.; SPEISK, H.; JIMENEZ. Boldine as a sunscreen. Cosmet Toiletries, n. 13, p. 59-66, 1998.

LIMA, M.M.A.; VIEIRA, L. F.; COSTA JUNIOR, J. S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia insignis* Mart.(CLUSIACEAE). In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. v. 2, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. de M.; CERQUEIRA, L. S. C. de; BEHR, N. von. Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Editora Plantarum, p.303, 1996.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. da; ALENCAR, J. da C. Essências madeiras da Amazônia. Manaus: CNPq/INPA. v. 1, p. 245, 1979.

LUCIA, M.; ROSSETTI, R.; FONSECA, L. D. E. S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 30, n. 4, p. 455–460, 2004.

MAINERI, C.; LOUREIRO, A. A. Madeiras de *Simphonia globulifera* L., *Platonia insignis* Mart., *Moronobea coccinea* Aubl. e *Moronobea pulchra* Ducke (Gutiferae): estudo anatômico macro e microscópico como contribuição para a sua identificação. Belém: CNPq/INPA, ed. 18, p. 27, 1964.

MENDES, M. B. et al. Pharmacological Evidence of α_2 -Adrenergic Receptors in the Hypotensive Effect of *Platonia insignis* Mart. Journal of Medicinal Food, v. 17, n. 10, p. 1079–1085, 2014.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal of Science and Technology, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2006.

NAKAYAMA, A G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. Journal Immunol Methods, ed. 204, p. 205-8, 1997.

OLIVEIRA et al., Evaluation of toxicity of *Calophyllum brasiliense* stem bark extract by in vivo and in vitro assays. Journal of Ethnopharmacology. Ed.1, v. 155, p. 30-8, 2014.

PRIOR, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* ed.10, p.4290-4302, 2005.

RAMOS, M.F.S.; SANTOS, E.P.; BIZARRI, C.H.B.; MATTOS, H.A.; PADILHA, M.R.S.; DUARTE, H.M. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *International Journal of Cosmetic Science*, n.18, p.87-101.1996.

RUFINO MSM, ALVES RE, BRITO ES, PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURACALIXTO F, MANCINI-FILHO J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. ed. 4, v.121, p. 996-1002, 2010.

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

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, n. 299, p 152-177, 1999.

SOUSA, M. S. B et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

SOUSA, M. A. Enraizamento de estacas de secção radicular de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) sob influência de ácido indolbutírico e substratos. Monografia (graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, p.31, 2000.

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

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U. de; MÜLLER, C. H.; DIAZ, C. S.; ALMANZA, M. Frutales y hortalizas promissórias de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica. Secretaria Pro-tempore, p.367, 1996.

YAMAGUCHI et al. QUÍMICA E FARMACOLOGIA DO BACURI (*Platonia insignis*). *Scientia Amazonia*, v.3, n. 2 p. 39–46, 2014.

LIU, H. et al. Ultraviolet B Inhibits Skin Wound Healing by Affecting Focal Adhesion Dynamics. *Photochemistry and photobiology*, v. 91, n. 4, p. 909–16, jul. 2015.

YOO, H. G. et al. Lithospermum erythrorhizon extract protects keratinocytes and fibroblasts against oxidative stress. *Journal of medicinal food*, v. 17, n. 11, p. 1189–96, nov. 2014.