



# Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore

George Laylson da Silva Oliveira<sup>1,\*</sup>; Antonio Luiz Gomes Júnior<sup>1</sup>; Francisco Rodrigo de Asevedo Mendes de Oliveira<sup>1</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das folhas da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore. As folhas foram coletadas na cidade de Teresina-PI, secas por quatro dias, trituradas, moídas e extraídas por maceração por 16 dias com troca do solvente (etanol 95%) a cada quatro dias. Depois o extrato etanólico foi filtrado, concentrado em evaporador rotatório, liofilizado e a sua massa determinada. Foi avaliada a capacidade antioxidante *in vitro* utilizando os métodos do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS•+). Para determinar a capacidade antioxidante *in vivo*, foram utilizadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes em defesas antioxidantes como modelo de estudo. A análise fitoquímica quantitativa resultou nos seguintes valores de compostos fenólicos (1454,54±12,56 mgEAG/g de extrato e 167,27±1,44 mgEAG/g de material seco), flavonoides (645,73±2,42 mgR/g de extrato e 74,26±0,27 mgR/g material seco), taninos hidrolisáveis (64 mgEAG/g de extrato) e alcaloides (28,86% presentes no material vegetal seco). A análise antioxidante demonstrou que o extrato etanólico da *C. prunifera* tem uma capacidade elevada de reduzir os radicais DPPH• e ABTS•+, demonstrando ação antioxidante. Os estudos *in vivo* vêm afirmar a ação antioxidante *in vitro* do extrato etanólico da *C. prunifera* ao proteger cepas de *S. cerevisiae* contra o dano oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. Concluiu-se que o extrato etanólico da *C. prunifera* pode ser uma potencial fonte de compostos antioxidantes.

**Palavras-chave:** *C. prunifera*. DPPH•. ABTS•+. *S. cerevisiae*. Capacidade antioxidante.

## INTRODUÇÃO

A *Copernicia prunifera* é uma planta que pertence à família Arecaceae, adaptada ao clima quente e seco e é bastante conhecida na região do Nordeste (Piauí, Maranhão) como carnaúba (Crespo, 2007; Alves & Coelho, 2008). A cera produzida pelas folhas da carnaúba forma o pó de carnaúba, uma matéria-prima muito comercializada apresentando grande importância para indústrias química, eletrônica, cosmética, alimentícia e farmacêutica (Carvalho & Gomes, 2007; Crespo, 2007).

A *C. prunifera* é conhecida popularmente como “Árvore da vida”, pois tem uso variado pelo homem. Das folhas é extraída a cera (pó de carnaúba), a qual pode ser utilizada na produção de cosméticos, produção de cápsulas para medicamentos e pode também ser utilizada como um potente inibidor da peroxidação lipídica, apresentando efeitos antioxidantes, além de anti-inflamatório e antifúngico. As raízes podem ser utilizadas como medicamento para o tratamento de úlceras, sífilis, erupções cutâneas, reumatismo e artrite e também possuem efeitos antioxidantes. Os frutos são comestíveis e das sementes pode ser extraído óleo ou ser feito chá, o que pode ser usado como energético (Braga, 1976; Sousa et al., 2007). A atividade antifúngica foi também atribuída às folhas da *C. prunifera*, segundo os trabalhos de Lima Junior et al. (2012).

O interesse em trabalhar com plantas está em saber se elas possuem algum valor terapêutico, e para nosso conhecimento, poucos estudos têm sido realizados sobre a capacidade antioxidante das folhas da *C. prunifera*. Logo, o presente trabalho tem como objetivo fornecer dados científicos relativos à capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. prunifera* e compará-los com os resultados da análise fitoquímica quantitativa. Foram realizados testes para o estudo da capacidade antioxidante *in vivo* em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes em defesas antioxidantes, avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS•+). Foi realizado

*Autor correspondente:* George Laylson da Silva Oliveira. Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPI, Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: georgenota10@hotmail.com

também um estudo fitoquímico quantitativo para fenólicos totais, flavonoides, tanino hidrolisável e alcaloides.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e preparação do extrato

As folhas da *C. prunifera* foram coletadas na zona sudeste do município de Teresina-PI, no período de agosto de 2011 e uma excisada de nº 21107 foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí-UFPI. As folhas foram secas a temperatura ambiente por quatro dias, depois trituradas, moídas em um moinho de facas para obter 100g e posteriormente extraídas à temperatura ambiente, pelo método de maceração por 16 dias com renovação do solvente (etanol 95%) a cada quatro dias. O material extraído com etanol 95% foi filtrado, concentrado parcialmente em evaporador rotatório com pressão reduzida à temperatura de 50 °C e 40 rpm (rotações por minuto), liofilizado e foi determinado seu rendimento.

### Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenólicos totais do extrato etanólico da *C. prunifera* foi determinado de acordo com Singleton et al. (1999), através do método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, que envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos e, concomitante, formação de um complexo azul. Uma alíquota de 200 µL do extrato foi solubilizado em metanol na concentração de 1000 µg/mL, e foi misturada com o reagente de Folin-Ciocalteu, depois a solução foi agitada durante 1 minuto e adicionado 200 µL de carbonato de sódio (10%). A mistura foi deixada em repouso e a absorbância foi medida após duas horas de reação, no comprimento de 750 nm. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g E) e em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de material vegetal seco (mgEAG/g MVS). O teor de fenóis totais foi obtido a partir de uma curva de calibração realizada com ácido gálico ( $y = 0,121x + 0,011$ ;  $r^2 = 0,9819$ ), na qual  $y$  representa a absorbância medida e  $x$  a concentração equivalente de ácido gálico.

### Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado com base na formação de um complexo de flavonoide-alumínio, utilizando a metodologia de Oyedemi et al. (2012). A análise foi realizada em triplicata e os resultados de flavonoides totais foram expressos em miligrama de equivalente de rutina por grama de extrato (mgR/g E) e em miligrama de equivalente de rutina por grama de material vegetal seco (mgR/g MVS). Para determinação deste teor foi utilizada a curva de calibração da rutina ( $y = 0,0182x - 0,004$ ;  $r^2 = 0,9949$ ), na qual  $y$  representa a absorbância medida e  $x$  a concentração equivalente de rutina.

### Determinação do teor de tanino hidrolisável

O teor de tanino hidrolisável do extrato etanólico da *C. prunifera* foi determinado com o ensaio de iodeto de potássio (Vermerris & Nicholson, 2006). Para 3 ml do extrato, 1 ml de uma solução saturada de iodeto de potássio foi adicionada e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 40 minutos. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro a

550 nm. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g E). Foi utilizada a curva de calibração do ácido gálico ( $y = 0,121x + 0,011$ ;  $r^2 = 0,9819$ ), na qual  $y$  representa a absorbância medida e  $x$  a concentração equivalente de ácido gálico.

### Determinação do conteúdo de alcaloides

O conteúdo total de alcaloides foi determinado de acordo com a metodologia utilizada por Oyedemi et al. (2012). Um volume de 20 mL de ácido acético a 10% preparado em etanol foi adicionado a 5 gramas do material vegetal seco em pó, depois coberto e deixado repousar durante quatro horas. Realizou-se a filtração e o produto obtido foi reduzido para um quarto do seu volume original usando o método Banho-Maria a 55 °C. Hidróxido de amônio concentrado foi adicionado gota a gota ao extrato para formação de um precipitado. A solução total foi deixada em repouso e filtrada mais uma vez, após lavagem com hidróxido de amônio diluído. O resíduo obtido foi seco, pesado e a composição percentual foi determinada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de alcaloide} = \frac{\text{peso final da amostra}}{\text{peso inicial do extrato}} \times 100$$

### Capacidade antioxidante pelo método DPPH•

Foi utilizada a metodologia descrita por Silva et al. (2005) com algumas modificações. Foi preparada uma solução estoque do extrato etanólico (250 µg/mL), do DPPH• (40 µg/mL) e dos padrões ácido gálico (250 µg/mL), quercetina (250 µg/mL) e rutina (250 µg/mL). As concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL do extrato e dos padrões foram preparadas por diluição. A mistura reacional (0,3 mL da solução do extrato mais 2,7 mL da solução estoque de DPPH•) foi incubada a temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 minutos e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 517 nm. A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de capacidade antioxidante (% CA) pela seguinte equação:

$$\% \text{ CA} = \frac{(\text{Abs. controle} - \text{Abs. extrato}) \times 100}{\text{Abs. controle}}$$

em que, Abs. controle é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH• e Abs. extrato é a absorbância da mistura reacional (DPPH• + extrato). A concentração inibitória (CI50) do extrato necessária para reduzir o radical DPPH• em 50%, foi determinada por regressão Probit (Locatelli et al., 2009).

### Capacidade antioxidante pelo método ABTS•+

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do ABTS•+, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999), com modificações. Inicialmente formou-se o cátion radical ABTS•+, a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS•+ com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas (Oliveira et al., 2014). Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até obter uma solução com absorbância de 0,70 ( $\pm 0,05$ ), a 734 nm. Prepararam-se as concentrações finais de 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL do extrato e dos padrões rutina, quercetina e ácido gálico.

Em ambiente escuro e em temperatura ambiente foi transferida uma alíquota de 40  $\mu$ L de cada amostra para tubos de ensaio com 1960  $\mu$ L do radical ABTS $\bullet$ +. Realizou-se a leitura da absorbância a temperatura ambiente nos tempos de 1, 4 e 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm e os resultados foram expressos em valores de TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), a partir de uma curva padrão preparada com Trolox (Figura 1). A curva padrão foi preparada por medição da redução da absorbância da solução ABTS $\bullet$ + com diferentes concentrações entre 0,1 e 2 mM.

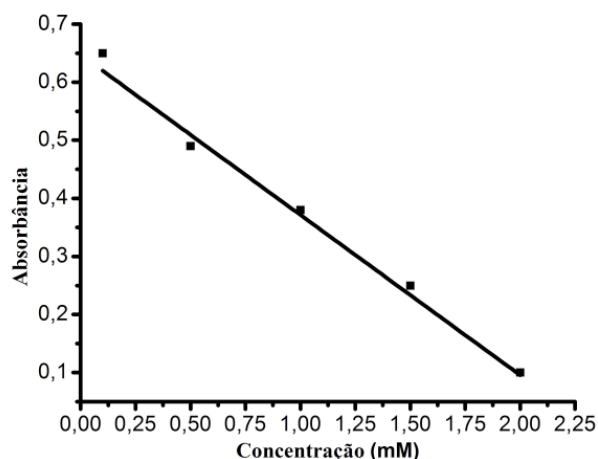


Figura 1: Curva padrão do Trolox para a determinação do TEAC.

De acordo Re et al. (1999), o resultado antioxidante pode também ser determinado como percentagem de inibição da absorbância da solução de ABTS a 734 nm e representada graficamente como uma função da concentração. As mesmas absorbâncias utilizadas para obter os valores do TEAC do extrato etanólico da *C. prunifera* e dos controles rotina, quercetina e ácido gálico, foram utilizadas para obter os valores da percentagem de inibição da solução de ABTS $\bullet$ +

### Capacidade antioxidante em células de levedura

#### *Saccharomyces cerevisiae*

Para os ensaios de atividade antioxidante, foram utilizadas linhagens proficientes (Sod wt) e deficientes (Sod1 $\Delta$ , Sod2 $\Delta$ , Sod1 $\Delta$ Sod2 $\Delta$ , Cat1 $\Delta$ , Sod1 $\Delta$ Cat1 $\Delta$ ) no sistema de defesa antioxidante, no teste chamado disco central segundo a metodologia descrita por Fragoso et al. (2008), com modificações. As linhagens de *S. cerevisiae* proficiente e deficiente em superóxido dismutase (Sod) e/ou catalase (Cat) estão descritos na Tabela 1.

Para a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. prunifera*, três tipos de tratamento foram realizados utilizando as linhagens em fase estacionária ( $2 \times 10^8$  células/mL) de *S. cerevisiae*: co-tratamento, pré-tratamento e pós-tratamento. No co-tratamento, foi adicionado simultaneamente o extrato nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL e o peróxido de hidrogênio no disco de papel filtro no centro da placa de YEPD (Extrato de Levedura-Peptona-Dextrose). Para avaliação

Tabela1: Linhagens de *S. cerevisiae* usadas na avaliação antioxidante.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (Sod wt)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, Los Angeles
EG118 (Sod1 $\Delta$ )	Sod1::URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, Los Angeles
EG110 (Sod2 $\Delta$ )	Sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, Los Angeles
EG133 (Sod1 $\Delta$ Sod2 $\Delta$ )	Sod1::URA3 Sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, Los Angeles
EG223 (Cat1 $\Delta$ )	EG103, except Cat1:: TRP1	Edith Gralla, Los Angeles
EG (Sod1 $\Delta$ Cat1 $\Delta$ )	EG103, except Sod1:: URA3 and Cat1:: TRP1	Edith Gralla, Los Angeles

do pré-tratamento, o extrato nas mesmas concentrações do co-tratamento foi adicionado primeiramente no disco de papel filtro e três horas depois, adicionou-se o peróxido de hidrogênio. No pós-tratamento foi adicionado, primeiramente, o peróxido de hidrogênio e três horas após, adicionou-se o extrato nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200  $\mu$ g/mL. Após 48 horas de incubação em estufa a 37 °C, mediu-se o halo de inibição do crescimento em milímetros desde a margem do disco de papel-filtro para o início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 30 mm (ausência de crescimento), sendo este o raio da placa de petri. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em cada avaliação, as linhagens foram estriadas em placa de YEPD contendo no centro um disco de papel filtro, no qual foi adicionado 10  $\mu$ L de extrato e 10  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio (40 mM). Um controle somente com peróxido de hidrogênio foi realizado para todas as linhagens de *S. cerevisiae*.

### Análise estatística

O programa Microcal Origin 8.0 foi utilizado para obtenção dos valores das médias  $\pm$  DP (desvio padrão). Diferenças significativas entre as médias foram determinada usando análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism 5.01. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativamente diferentes. Para avaliar a relação entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante, o coeficiente de correlação de Pearson foi calculado com confiança de 95% através do programa GraphPad Prism 5.01.

## RESULTADOS

O extrato etanólico das folhas de *C. prunifera* apresentou rendimento de 15%. Este extrato foi utilizado para a avaliação do teor de fenóis, flavonoides, taninos hidrolisáveis e avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*. Para

a determinação do conteúdo de alcaloides foi utilizado o material vegetal seco.

**Determinação dos teores de fenóis, flavonoides, taninos hidrolisável e do conteúdo de alcaloides.**

Os resultados da análise fitoquímica quantitativa do extrato etanólico da *C. prunifera* indicaram altos valores de compostos fenólicos (1454,54±12,56 mgEAG/g E e 167,27±1,44 mgEAG/g MVS), flavonoides (645,73±2,42 mgR/g E e 74,26±0,27 mgR/g MVS) e tanino hidrolisável (64 mgEAG/g E). O resultado para alcaloides foi 28,86% para o material vegetal seco em pó.

**Capacidade antioxidante pelo método do DPPH•**

O resultado apresentado na Tabela 2 demonstra que o extrato etanólico apresenta uma boa capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•. Os valores da capacidade antioxidante nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL são superiores e significativamente diferentes da capacidade antioxidante do controle positivo rutina. A capacidade antioxidante do extrato em estudo nas concentrações de 25 e 50 µg/mL foram inferiores com diferença significativa em relação à quercetina nas mesmas concentrações, mas nas concentrações acima de 100 µg/mL, a capacidade antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera* foi superior e significativamente diferente (Tabela 2). Em relação ao ácido gálico, a capacidade antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera* foi inferior em todas as concentrações testadas, sendo significativamente diferente nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, enquanto que nas concentrações de 150 e 200 µg/mL a capacidade antioxidante não indicou diferença significativa.

Tabela 2: Capacidade antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera*, rutina, quercetina e ácido gálico a base do teste de DPPH•.

Concentração	Capacidade antioxidante (%)			
	<i>C. prunifera</i>	Rutina	Quercetina	Ácido gálico
25 µg/mL	14,20±2,3abc	25,37±2,15	55,99±2,15	89,87±0,83
50 µg/mL	49,68±1,32bc	32,65±1,77	79,59±0,97	92,95±0,10
100 µg/mL	86,69±3,19c	37,96±0,36	81,50±0,25	93,19±0,06
150 µg/mL	92,09±1,06	60,85±6,33	81,87±0,21	93,71±0,15
200 µg/mL	93,36±0,15	64,22±1,76	82,18±0,15	93,95±0,47
CE50 µg/mL	50,70	111,96	10,25	1,20

Os valores da CI50 do extrato etanólico da *C. prunifera* (50,70), rutina (111,96), quercetina (10,25) e ácido gálico (1,20) estão descritos na Tabela 2. Foi verificado que o extrato etanólico da *C. prunifera* apresenta uma CI50 menor que o controle positivo rutina, e quanto menor o valor do CI50, maior a capacidade antioxidante de uma amostra.

**Capacidade antioxidante pelo método do ABTS•+**

Para análise da capacidade antioxidante pelo método do ABTS•+, obteve-se o TEAC do extrato etanólico da *C. prunifera* nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL, a partir da curva padrão do Trolox (r<sup>2</sup>=0,989) em

Tabela 3. Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) do extrato etanólico da *C. prunifera*, rutina, quercetina e ácido gálico a base do teste ABTS•+.

Amostras	TEAC, mM de Trolox		
	1 minuto	4 minuto	6 minuto
<i>C. prunifera</i>	3,15±0,38c	4,53±0,10c	5,76± 0,08c
Rutina	1,45±0,10	1,75±0,10	1,89±0,05
Quercetina	3,76±0,11	5,01±0,23	6,05±0,25
Ácido gálico	8,03±0,13	12,84±0,08	13,21±0,03

três tempos diferentes e realizou-se a comparação com o TEAC do controle positivo rutina, quercetina e ácido gálico (Tabela 3).

Os valores do TEAC são dependentes do tempo e nos tempos de 1, 4 e 6 minutos, foi observado que os valores do TEAC do extrato da *C. prunifera* foram superiores e significativamente diferentes do TEAC do controle positivo rutina. Em relação aos valores do TEAC da quercetina e do ácido gálico, foi verificado que os valores do TEAC do extrato da *C. prunifera* foram inferiores e significativamente diferentes somente em relação ao ácido gálico.

De acordo com os gráficos da figura 2, as concentrações 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL do extrato etanólico da *C. prunifera* apresentaram um resultado antioxidante ou de inibição da solução de ABTS•+ superior aos valores da rutina nas mesmas concentrações. Quando os resultados antioxidantes do extrato etanólico da *C. prunifera* são comparados com os valores da quercetina e do ácido gálico, verifica-se que o extrato da *C. prunifera* apresenta valores de inibição da solução de ABTS•+ inferiores.

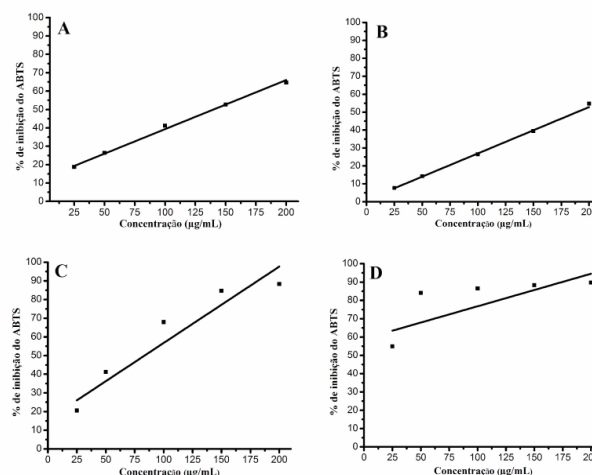


Figura 2. Resultados da ação antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera* e dos controles rutina, quercetina e ácido gálico sobre a inibição da solução de radical ABTS •+. (A) *C. prunifera* (r<sup>2</sup> = 0,993), (B) rutina (r<sup>2</sup> = 0,994), (C) quercetina (r<sup>2</sup> = 0,877), (D) ácido gálico (r<sup>2</sup> = 0,619).

**Correlação entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante**

De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson (r), uma alta relação entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• foi

observada (Figura 3), demonstrando que quanto maior a concentração de compostos fenólicos, maior é a capacidade antioxidante.

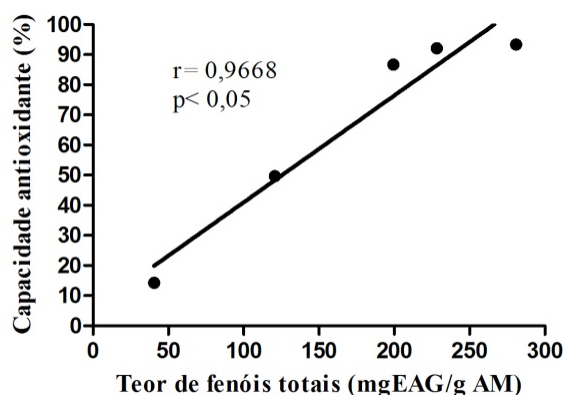


Figura 3: Correlação entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante pelo método DPPH•.

**Capacidade antioxidante em linhagens de levedura *S. cerevisiae***

No pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento (Figura 4), foi observado uma tendência à diminuição na inibição do crescimento e consequente aumento da sobrevivência das linhagens de *S. cerevisiae* (Sod wt, sod1Δ, sod2Δ, sod1Δsod2Δ, cat1Δ, sod1Δcat1Δ) em todas as concentrações do extrato etanólico da *C. prunifera*, de forma estatisticamente significativa em relação ao agente estressor (Peróxido de hidrogênio).

No pré-tratamento e co-tratamento (Figura 4), o extrato etanólico da *C. prunifera*, apresentou capacidade antioxidante significativa para todas as linhagens de *S. cerevisiae* de maneira dose-dependente, permitindo o aumento da sobrevivência das linhagens testadas e inibindo o efeito oxidativo do peróxido de hidrogênio. As concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL foram as que mais apresentaram capacidade protetora ou antioxidante. Como esperado, a linhagem de *S. cerevisiae* selvagem (Sod wt) apresentou um maior nível de sobrevivência, enquanto as linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes foram mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio (Figura 4), confirmando a importância da enzima superóxido-dismutase e catalase na proteção celular contra o estresse oxidativo. É importante notar que a capacidade antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera* foi observada na linhagem Sod wt bem como nas linhagens deficientes em sod1Δ, sod2Δ e cat1Δ, sugerindo que o seu efeito protetor é independente da atividade de superóxido dismutase e/ou catalase.

No pós-tratamento (Figura 4), o DNA das linhagens de *S. cerevisiae* foi primeiro exposto ao dano oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio, e após três horas foi adicionado o extrato etanólico da *C. prunifera* para verificar a capacidade de reparo frente ao dano oxidativo. Em todas as concentrações testadas, o extrato etanólico da *C. prunifera* apresentou significativa capacidade de reparo para as linhagens Sod wt, sod1Δ, sod2Δ, sod1Δsod2Δ, cat1Δ, sod1Δcat1Δ. A concentração de 200 µg/mL foi a que apresentou a maior capacidade de reparo de dano.

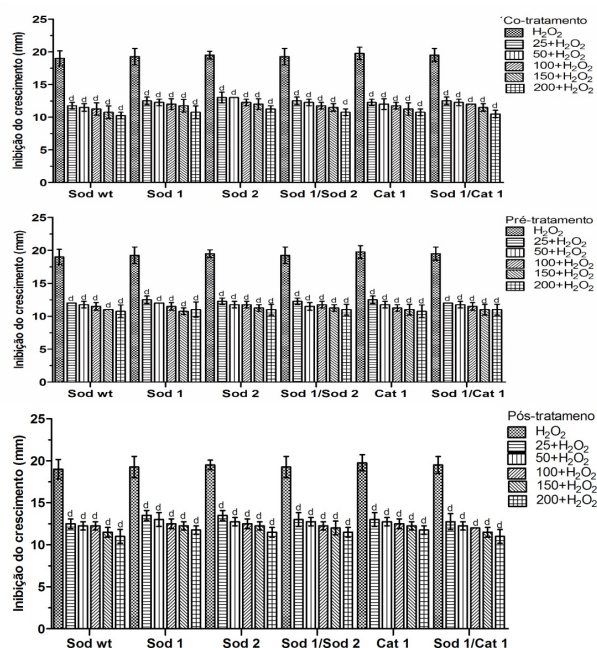


Figura 4. Capacidade antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera* frente ao dano oxidativo induzido em linhagens de levedura *S. cerevisiae*. d Significância em relação ao agente estressor (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Os resultados obtidos da avaliação antioxidante *in vivo* estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Capacidade antioxidante e reparadora do extrato etanólico da *C. prunifera* em linhagens de *S. cerevisiae*.

Tratamento/ Atividade	Linhagens de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	<i>C. prunifera</i>				
		25 µg/ mL	50 µg/ mL	100 µg/ mL	150µg/ mL	200 µg/ mL
Co- tratamento/ Antioxidante	Sod wt	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod2	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Sod2	✓	✓	✓	✓	✓
	Cat1	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Cat1	✓	✓	✓	✓	✓
Pré- tratamento/ Antioxidante	Sod wt	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod2	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Sod2	✓	✓	✓	✓	✓
	Cat1	✓	✓	✓	✓	✓
Pós- tratamento /Reparo de dano oxidativo	Sod1Cat1	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod wt	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod2	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Sod2	✓	✓	✓	✓	✓
	Cat1	✓	✓	✓	✓	✓
	Sod1Cat1	✓	✓	✓	✓	✓

✓ Atividade observada

## DISCUSSÃO

Na literatura científica não foram encontrados trabalhos que abordem a parte fitoquímica de forma quantitativa de extratos das folhas da *C. prunifera*, e o resultado obtido neste estudo mostra que o extrato etanólico da *C. prunifera* é uma fonte de compostos fenólicos, como flavonoides, taninos e de alcaloides. Aos compostos fenólicos e flavonoides encontrados em extratos de plantas, podem ser atribuídas atividades biológicas como analgésica, antimicrobiana, antimutagênica, anti-inflamatória e se destacam como os dois grupos fitoquímicos mais importantes com propriedades antioxidantes de origem natural (Verri Jr et al., 2012). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos e flavonoides podem ser atribuídos a sua capacidade de atuar como doadores de átomos de hidrogênio, agentes redutores e supressores de oxigênio singlete (Letelier et al., 2008; Galleano et al., 2010).

Os resultados antioxidantes mostraram que o extrato das folhas da *C. prunifera* tem uma capacidade antioxidante elevada frente aos radicais DPPH• e ABTS•+. Ambos os métodos baseiam-se na redução ou perda da absorvância da solução alcoólica de DPPH• e ABTS•+, o que resulta numa descoloração da solução alcoólica de DPPH• e ABTS•+ (Floegel et al., 2011).

A avaliação antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. prunifera* frente ao radical DPPH• demonstrou ser dependente da concentração e foi observado que nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL, a capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. prunifera* foi maior que o da rutina e quercetina, mas quando comparado os valores da CI50, o extrato etanólico das folhas da *C. prunifera* foi menos eficaz em reduzir o radical DPPH• do que a quercetina, que apresentou uma CI50 no valor de 10,25 µg/mL. O método de DPPH• é bastante aceito para avaliação da capacidade antioxidante de substâncias como extratos de plantas. Os resultados obtidos nessa avaliação antioxidante estão de acordo com os resultados de Silva et al. (2005) e Rodrigues (2004), que avaliaram a capacidade antioxidante em concentrações parecidas com as realizadas neste trabalho, pelo método DPPH• do extrato etanólico das folhas da Copernicia cerifera, sinônimo de *C. prunifera*, e demonstraram que o extrato das folhas apresentam uma capacidade antioxidante superior ao controle positivo rutina.

O teor de fenólicos totais de extratos geralmente tem sido correlacionado com o método DPPH• para determinar a contribuição dos compostos fenólicos para a capacidade antioxidante, e por isso, uma correlação entre a capacidade antioxidante obtida pelo método DPPH• e a concentração de compostos fenólicos foi realizada. O resultado obtido indicou uma forte correlação positiva ( $r=0,9668$ ), mostrando que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. prunifera*. O método de Folin-Ciocalteu, utilizado para a determinação dos compostos fenólicos é também um método de determinação da capacidade antioxidante, baseado nas propriedades redox das substâncias. Assim, os valores da concentração dos compostos fenólicos expressam a capacidade antioxidante da amostra em estudo, confirmando uma correlação altamente significativa entre o valor do método de Folin-Ciocalteu e o método DPPH•.

Os valores do TEAC e da porcentagem de inibição da solução de ABTS•+, na qual reflete a capacidade relativa de uma amostra antioxidante de doar átomos de hidrogênio ou elétron para eliminar o cátion radical ABTS•+ (Erel, 2004), também foi determinado. O resultado obtido demonstrou que o extrato etanólico da *C. prunifera* tem uma capacidade antioxidante alta, existindo uma dependência de tempo sobre o valor do TEAC, sendo a maior atividade antioxidante observada no tempo de seis minutos. A avaliação antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. prunifera* pelo método de eliminação do cátion radical ABTS•+ foi relatado pela primeira vez neste trabalho, apesar de avaliações antioxidantes anteriores já terem sido realizadas sobre esta planta.

A raiz é principal estrutura da *C. prunifera* utilizada como medicinal pela população, mas as folhas se destacaram neste estudo como tendo um potencial antioxidante e um teor de fenóis totais bem mais elevado que o da raiz, quando comparado com os estudos de Sousa et al. (2007) que obtiveram uma CI50 pelo método DPPH• de 111,14±12,48 µg/mL e um teor de fenóis totais no valor de 250,00±8,20 mgEAG/g E. Logo, com uma CI50 de 50,70 µg/mL e um teor de fenóis totais no valor de 1454,54±12,56 mgEAG/g E, as folhas da *C. prunifera* podem ter um efeito terapêutico mais benéfico do que a raiz.

A avaliação antioxidante, pelo método DPPH• e ABTS•+, fornece apenas uma indicação da capacidade de uma substância de remover radicais livres (Wu et al., 2011) e não indica o efeito de um antioxidante sobre a sobrevivência celular. Logo é importante verificar se a substância em estudo apresenta capacidade antioxidante *in vivo*. Assim, foi avaliada a capacidade antioxidante do extrato etanólico da *C. prunifera* utilizando as linhagens da levedura de *S. cerevisiae*, que é um modelo de organismo ideal para avaliar se amostras como extrato de planta apresentam capacidade antioxidante *in vivo* (Frassinetti et al., 2012). O resultado apresentado neste trabalho mostra a capacidade do extrato etanólico da *C. prunifera* em proteger as linhagens de *S. cerevisiae* contra o efeito oxidativo do peróxido de hidrogênio no co-tratamento, pré-tratamento e pós-tratamento, diminuindo assim significativamente a inibição do crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* e confirmando que a amostra em estudo apresenta capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

A ação oxidativa do peróxido de hidrogênio ao DNA das linhagens de *S. cerevisiae* pode resultar em uma série de danos como modificação de bases e quebra de cadeia. Logo, o extrato etanólico da *C. prunifera* apresentou uma elevada capacidade de reparo de dano, principalmente nas concentrações mais elevadas. A capacidade de reparo observada no pós-tratamento pode ser explicada em parte pela capacidade antioxidante encontrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O efeito oxidativo do peróxido de hidrogênio em linhagens de *S. cerevisiae* já foi avaliado em estudos anteriores desenvolvido por Rodrigues (2004), no qual a metodologia utilizada foi diferente da realizada nesse estudo e os resultados obtidos indicou atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da *C. cerifera* sobre as células de *S. cerevisiae*, com um percentual de sobrevivência de 11,5%.

Os nossos resultados antioxidantes em linhagens de *S. cerevisiae* obtidos comprovam os resultados de

Rodrigues (2004) de uma forma mais abrangente, pois foram utilizadas seis linhagens diferentes de *S. cerevisiae* para avaliação antioxidante *in vivo*, em três tipos diferentes de tratamento. Logo, a utilização do extrato da *C. prunifera* abre uma nova perspectiva para a procura de novas substâncias bioativas, principalmente com capacidade antioxidante. Mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de isolar e determinar as substâncias químicas bioativas no extrato etanólico da *C. prunifera*.

## ABSTRACT

*Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo of the ethanol extract of Copernicia prunifera (Mill.) H. E. Moore*

The aim of this study was to assess the *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity of the ethanol extract of *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore leaves. The leaves were collected in the city of Teresina, Piauí state (Brazil), dried for 4 days, crushed and extracted by maceration in 95% ethanol for 16 days, with a change of solvent every four days. Afterwards, the ethanol extract was filtered, concentrated in a rotary evaporator, lyophilized and weighed. Its *in vitro* antioxidant activity was determined as the capacity to scavenge the radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS•+). To determine the antioxidant capacity *in vivo*, *Saccharomyces cerevisiae* strains with normal and defective antioxidant defenses were used as a study model. The quantitative phytochemical analysis revealed the following components: phenolic compounds ( $1454.54 \pm 12.56$  mgGAE/g of extract and  $167.27 \pm 1.44$  mgGAE/g of dry material), flavonoids ( $645.73 \pm 2.42$  MgR/g of extract and  $74.26 \pm 0.27$  mgR/g dry material), hydrolysable tannins (64 mgGAE/g of extract) and alkaloids (28.86% dry material). The antioxidant analysis showed that the ethanol extract of *C. prunifera* has a high capacity to reduce the radicals DPPH• and ABTS•+, demonstrating its antioxidant capacity. The *in vivo* study results confirmed the *in vitro* antioxidant action of the ethanol extract of *C. prunifera*, which protected *S. cerevisiae* strains against oxidative damage induced by hydrogen peroxide. Therefore, it was concluded that the ethanol extract of *C. prunifera* may be a potential source of antioxidant compounds.

**Keywords:** *C. prunifera*. DPPH•. ABTS•+. *S. cerevisiae*. Antioxidant capacity.

## REFERÊNCIAS

- Alves MO, Coelho JD. Extrativismo da Carnaúba: relações de produção, tecnologia e mercados. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil; série documentos do ETENE; 2008. p.214.
- Braga R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará e Mossoró. Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976.
- Carvalho FPA, Gomes JMA. Análise de eficiência econômica e ambiental na produção de pó e cera de carnaúba In: Gomes JMA, Santos KB, Soares SM. Cadeia Produtiva da Carnaúba: diagnóstico e cenários. Teresina: EDUFPI; 2007.
- Crespo MFV. Estratégia de desenvolvimento do arranjo produtivo local da carnaúba em Ilha Grande de Santa Isabel (PI): área de proteção ambiental Delta do Parnaíba [Dissertação]. Teresina: Ciências Farmacêuticas, UFPI; 2007.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. 2004;37(4):277-85.
- Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J Food Compost Anal. 2011; 24(7):1043-8.
- Fragoso V, Nascimento NCd, Moura DJ, Silva ACRE, Richter MF, Saffi J, et al. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. Toxicol *in vitro*. 2008;22(3):559-66.
- Frassinetti S, Della Croce CM, Caltavuturo L, Longo V. Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem. 2012;135(3):2029-34.
- Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. Arch Biochem Biophys. 2010;501(1):23-30.
- Lima Junior CF, Oliveira GLS, Nunes JN, Machado LM. Avaliação do potencial antifúngico da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*. 64ª Reunião Anual da SBPC; 2012; São Luís/MA: Universidade Federal do Maranhão – UFMA; 2012.
- Letelier ME, Molina-Berrios A, Cortés-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Holst M, Palma K, et al. DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. Toxicol *In vitro*. 2008; 22(2):279-86.
- Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coisson J-D, Rinaldi M, Arlorio M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. Food Chem. 2009;114(3):889-97.
- Oliveira, GLS, Oliveira, FRAM, Alencar MVOB, Junior ALG, Araujo AS, Cavalcante AAC, Freitas RM. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. Afr J Pharm Pharmacol. 2014; 8(5);136-147.
- Oyedemi SO, Oyedemi BO, Arowosegbe S, Afolayan AJ. Phytochemicals Analysis and Medicinal Potentials of Hydroalcoholic Extract from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm Stem Bark. Int J Mol Sci. 2012;13(5):6189-203.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1231-7.
- Rodrigues VP. *Copernicia cerifera* Mart.: Aspectos Químicos e Farmacológicos de uma Palmeira Brasileira

[Dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia, UFRJ; 2004.

Silva CG, Herdeiro RS, Mathias CJ, Panek AD, Silveira CS, Rodrigues VP, et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacol Res.* 2005;52(3):229-33.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Lester P, editor. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 1999. p.152-78.

Sousa CMdM, Silva HRe, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLSd, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova.* 2007;30:351-5.

Vermerris W, Nicholson R. Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Phenolic Compound Biochemistry*: Springer Netherlands; 2006. p.63-149.

Verri Jr WA, Vicentini FTMC, Baracat MM, Georgetti SR, Cardoso RDR, Cunha TM, et al. Chapter 9 - Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. In: Atta ur R, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*: Elsevier; 2012. p.297-330.

Wu MJ, O'Doherty PJ, Fernandez HR, Lyons V, Rogers PJ, Dawes IW, et al. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(4):379-87.

Recebido em 04 de janeiro de 2013.

Aceito em 15 de maio de 2013.