



# Atividade antioxidante e teor de fenólicos de folhas da *Terminalia catappa* Linn em diferentes estágios de maturação

Davi Novaes Ladeia Fogaça<sup>1,\*</sup>; Wilson Rodrigues Pinto Júnior<sup>2</sup>; Newton Oliveira Rêgo Júnior<sup>3</sup>; Genebaldo Sales Nunes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Campus Juvino Oliveira

<sup>2</sup>Doutorando em Ciências de Alimentos, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Engenheiro de Alimentos, UESB, Itapetinga, BA, Brasil

<sup>4</sup>Professor do curso de Engenharia de Alimentos, UESB, Itapetinga, BA, Brasil

## RESUMO

Foram determinados o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de folhas da *Terminalia catappa* Linn em diferentes estágios de maturação. O teor de fenólicos totais foi avaliado em extratos etanólicos e etanólicos acidificados, não havendo diferença significativa entre os mesmos ( $P > 0,05$ ); o teor de fenólicos médio foi de 15,77 (mg/g) e 15,41 (mg/g), para as folhas verdes e maduras, respectivamente, expressos em mg de catequina por g de amostra. A atividade antioxidante foi determinada pelo método de decomposição do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, sendo expressa como fator antioxidante (AOX), variando de 0,0140 (A/h) a 0,0767 (A/h), como atividade antioxidante (AA), variando de 0,00% a 84,92% e como razão da velocidade de oxidação (RVO), variando 0,1508 a 1,000, utilizando BHT como padrão. A atividade antioxidante do BHT e das amostras não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ), demonstrando a potencialidade de uso desta planta como fonte natural de compostos antioxidante em ambos os estágios de maturação.

**Palavras-chave:** *Terminalia catappa*. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos totais.

## INTRODUÇÃO

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação (Halliwell, 2001), podendo estes ser enzimáticos, como as superóxido dismutases, as catalases e a glutathione peroxidase, ou não enzimáticos, tais como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos. O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Droge, 2002).

Produtos sintéticos, tais como o butil hidroxitolueno (BHT), 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno, e o butil hidroxianisol (BHA), o qual é uma mistura dos isômeros 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol e 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol, que agem como sequestradores de radicais livres, e são bastante utilizados na indústria alimentícia (Ramalho & Jorge, 2006). No entanto, em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, que permitam a substituição dos produtos sintéticos ou a associação entre eles (Sousa et al., 2007).

A *Terminalia catappa* Linn (TCL), também conhecida como amendoieira-da-praia, é uma planta da família *Combretaceae*, muito encontrada em toda a costa brasileira e em regiões tropicais do mundo, sendo bastante utilizada como planta ornamental devido à sombra proporcionada pela sua copa (Paula, 2008).

A alta concentração de taninos nas folhas da planta revela que elas podem servir como fontes de antioxidantes naturais. Estudos recentes têm demonstrado potenciais de exploração da TCL como agente antibacteriano (Opara et al., 2012), antioxidante (Saroja & Annapoorani, 2012), antitumoral (Kotresha et al., 2012), antidiabético (Patel et al., 2012), hepatoprotetor e anti-inflamatório (Mohale et al., 2009).

As folhas e os frutos da TCL têm sido usados como fontes medicinais populares com ação antipirética e na prevenção de hepatoma e hepatites (Chen et al., 2000). Tradicionalmente, apenas as folhas caídas são usadas na preparação de infusões que são ingeridas como bebidas para tais tratamentos, pelo fato das folhas verdes apresentarem um sabor muito adstringente, devido à presença do alto teor de taninos, o que as inviabiliza para o consumo (Peterson & Johnson, 1978). Nagappa et al. (2003) observaram significativa atividade antidiabética produzida por extratos do fruto da amendoieira-da-praia, a qual pode ser atribuída ao potencial antioxidante desta espécie.

Este trabalho teve como objetivo a quantificação dos compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante de extratos das folhas da TCL em diferentes estágios de maturação, com a finalidade de obter mais informações que auxiliem na avaliação do potencial de aplicação da planta como fonte de antioxidantes naturais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo das amostras

As folhas da TCL foram coletadas em pontos distintos, na cidade de Itapetinga, Bahia, entre os meses de fevereiro e março. As folhas foram coletadas observando-se dois estágios de maturação: verdes (ainda ligadas à planta) e maduras (caídas com até 24 h). Logo após a coleta, as folhas foram lavadas com água deionizada e levadas a um secador artesanal com ventilação forçada à 55°C, onde permaneceram por 12 horas. Após a secagem, as folhas foram trituradas em um moinho de bancada, e o pó obtido foi classificado em peneiras Tyler para tamanho da partícula igual a 180 µm, para realização das análises (Lemos et al., 2011).

Foram preparados extratos etanólicos e etanólicos acidificados (2% v/v em HCl) para a quantificação dos compostos fenólicos, e para a avaliação da atividade antioxidante somente foram utilizados extratos etanólicos. Os extratos foram obtidos através da adição de 100 mililitros de solvente a 10 gramas do pó de cada amostra. A mistura foi homogeneizada utilizando-se de agitação constante durante 60 minutos, à temperatura ambiente (28°C ± 2°C). Em seguida, o material foi submetido à centrifugação a 3000 x g, durante 15 minutos (Kahkonen et al., 1999), o sobrenadante foi coletado e levado ao processo de concentração num evaporador rotativo a 65 °C, para remoção do solvente. Posteriormente, os concentrados foram ressuspensos em 50 mL dos solventes correspondentes e mantidos sob refrigeração até o momento da análise.

A acidificação do solvente para análise de fenólicos totais é indicada por alguns autores como forma de aumentar o percentual de extração dos compostos fenólicos, além de ajudar a estabilizar e prevenir possíveis isomerizações dos ácidos fenólicos (Lee, 2004).

Sheabar & Neeman (1988) encontraram uma solubilidade máxima de polifenóis de bagaços de oliva em uma fase orgânica em pH 4. Baublis et al. (2000) observaram que extratos aquosos de cereal homogeneizados submetidos a um tratamento de pH que simulava o trato gastrointestinal apresentaram uma atividade antioxidante maior que os extratos aquosos não tratados.

### Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais foi realizada através do procedimento proposto por Wettasinghe & Shahidi (1999) utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* (Merck) e adotando a catequina como padrão.

O teor de fenólicos foi determinado por leitura de absorbância em 773 nm e interpolação com uma curva analítica de solução padrão de catequina. A equação da curva analítica foi  $C = 8,787 \text{ Abs} + 0,170$  com  $R^2 = 0,9981$  ( $C$  = concentração da catequina em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $A$  = absorbância em 773 nm e  $R^2$  = coeficiente de correlação). As determinações foram realizadas em triplicata e os teores de fenólicos totais foram expressos em mg de catequina/g da

amostra desidratada. As absorbâncias foram determinadas através de um espectrofotômetro *Shimadzu UV Mini 1240*.

### Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos das folhas, do controle e do padrão utilizado (BHT), butil hidroxitolueno, foi determinada de acordo com o método de decomposição do  $\beta$ - caroteno/ácido linoleico (Marco, 1968). Hum (1) mg de  $\beta$ -caroteno foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio, em seguida, retirou-se 1 mL dessa solução e em um balão volumétrico, protegido da luz por um envoltório opaco, adicionou-se 200 mg de ácido linoleico e 100 mg de Tween 40. O clorofórmio foi removido por evaporação a 40°C por 5 minutos, adicionando-se suavemente ao resíduo 50 mL de água destilada, aerada previamente, para a formação de uma emulsão. Em tubos de ensaio identificados, foram preparadas as amostras através da adição de 40 µL dos extratos a 3 mL da emulsão contendo  $\beta$ -caroteno, o controle foi preparado adicionando-se 40 µL do solvente a 3 mL da emulsão com  $\beta$ -caroteno e a solução padrão foi resultado da adição de 40 µL da solução de BHT 1% a 3 mL da emulsão contendo  $\beta$ -caroteno. As absorbâncias dos extratos, solução de controle e padrão, foram monitoradas a 470 nm, durante 120 minutos, em intervalos de 15 minutos, sendo mantidos incubados em um banho-maria a  $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$  durante o período de análise.

A atividade antioxidante foi calculada por três métodos diferentes. No primeiro, o valor da absorbância foi lançado graficamente em função do tempo, em uma curva cinética, e o valor absoluto do coeficiente angular foi expresso como fator antioxidante (AOX). No segundo método, a atividade antioxidante (AA) foi calculada em termos de percentual de inibição relativa ao controle, usando a seguinte equação (Lima et al., 2004a): % inibição =  $(A-B / A) \times 100$ , onde  $A$  = absorbância inicial – absorbância final do controle e  $B$  = Absorbância inicial – absorbância final da amostra. A terceira forma de expressão da atividade antioxidante é baseada na razão da velocidade de oxidação (RVO), calculada de acordo com o método de Marinova et al. (1994), por meio da equação:  $RVO = B / A$ , em que  $A$  e  $B$  representam os mesmos parâmetros para o cálculo do % inibição.

### Análise estatística

O experimento foi conduzido através de um Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 3 (três) repetições. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias, através do programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (Ferreira, 2011).

## RESULTADOS

Pode-se observar através dos resultados obtidos (Tabela 1) que os teores de compostos fenólicos nas folhas da TCL não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ) com o estágio de maturação ou com a acidificação do solvente.

Tabela 1. Teores de compostos fenólicos totais em folhas de *Terminalia catappa* L. em diferentes estágios de maturação.

Estágio de maturação	Fenólicos totais (mg.g <sup>-1</sup> )*	
	Solventes**	
	Etanólico	Etanólico acidificado 2%
Verde	16,07 + 0,14 <sup>ab</sup>	15,47 + 0,80 <sup>ab</sup>
Madura	15,16 + 0,24 <sup>ab</sup>	15,66 + 0,40 <sup>ab</sup>

\*mg.g<sup>-1</sup> da amostra desidratada em equivalente de catequina. \*\* Médias em triplicata ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

O comportamento de decomposição do β-caroteno quando submetido à ação dos extratos, do BHT e do controle foram acompanhados no decorrer do tempo (Figura 1) para determinação do fator antioxidante (AOX), atividade antioxidante (AA) e razão da velocidade de oxidação (RVO). O calor fornecido através do aquecimento no banho-maria foi o responsável pelo desencadeamento das reações de degradação do β-caroteno.

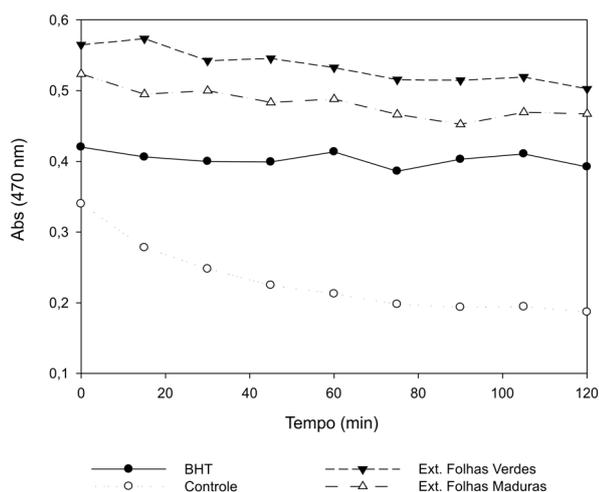


Figura 1. Curva de descolorimento do β-caroteno.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos.

Amostras	AOX (A/h)*	AA (%)*	RVO*
Controle	0,0767 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>	1,0000 <sup>a</sup>
BHT	0,0140 <sup>b</sup>	84,92 <sup>b</sup>	0,1508 <sup>b</sup>
Extrato folha verde	0,0312 <sup>b</sup>	65,53 <sup>b</sup>	0,3447 <sup>b</sup>
Extrato folha madura	0,0282 <sup>b</sup>	66,69 <sup>b</sup>	0,3331 <sup>b</sup>
P	0,0006	0,0010	0,0010
CV (%)**	23,93	24,42	29,13

\* Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). \*\* Coeficiente de variação percentual (%).

Os resultados comparativos da atividade antioxidante das soluções, avaliados através dos três métodos de expressão, podem ser observados através da

Tabela 2, não sendo detectadas diferenças significativas (P>0,05) entre os extratos das folhas verdes e maduras e a solução de BHT.

## DISCUSSÃO

Quimicamente os taninos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham moléculas poli-hidroxifenóis ou seus derivados, os taninos hidrolisáveis e os taninos condensáveis. A estrutura química básica dos taninos condensados é relacionada à estrutura da catequina (Bobbio & Bobbio, 2003). A conversão dos taninos condensáveis em outros compostos fenólicos é possivelmente uma causa para manutenção dos mesmos teores de fenólicos totais nas folhas maduras, as quais se diferenciam pela perda da coloração verde e ausência de adstringência quando comparadas às verdes. Como relatado por Peterson & Johnson (1978), o estágio de maturação das folhas tem relação direta com as características sensoriais das infusões.

A acidificação dos extratos não influenciou nos resultados encontrados, o que evidencia a potencialidade de uso de folhas da TCL como fonte de fenólicos em produtos que são submetidos a diferentes condições de acidez durante sua preparação ou beneficiamento, restringindo o número de antioxidantes viáveis para uso.

As folhas da TCL apresentaram um teor de compostos fenólicos médio (15,59 mg/g) semelhante a outros vegetais considerados como boas fontes de fenólicos, tais como, hortelã (*Mentha arvensis*) (17,10 mg/g); capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) (16,29 mg/g) e camomila (*Matricaria recutita*) (12,70 mg/g) (Lima et al., 2004b), sugerindo uma potencial fonte natural de componentes antioxidantes, abundante em grande parte do Brasil.

O fator antioxidante (AOX) das amostras é definido como o coeficiente angular das curvas de descolorimento do β-caroteno, ou seja, na ausência da oxidação a curva apresentará um coeficiente angular e um AOX igual a zero (0,0), assim sendo, quanto menor o valor do AOX maior será a capacidade antioxidante do composto. Os fatores antioxidantes das amostras não apresentaram diferenças significativas (P>0,05) entre o BHT e os extratos das folhas pelo Teste de Tukey, o que demonstra que a capacidade de proteção à oxidação exercida pelos extratos naturais é comparável ao do produto comercial.

A atividade antioxidante (AA) do BHT não diferiu significativamente (P>0,05) dos extratos das folhas verdes e maduras. O potencial antioxidante pode ser evidenciado através do comportamento da curva de descolorimento do β-caroteno que caracteriza um o baixo nível de degradação deste composto frente ao uso do antioxidante comercial ou dos extratos das folhas. Estas amostras apresentaram comportamentos distintos daquele observado com a solução controle, a qual apresentou uma maior diminuição da absorbância em função do tempo de análise, como resultado da decomposição do β-caroteno provocado pelo processo oxidativo.

Compostos que apresentam uma elevada AA (% inibição) demonstram reduzir efetivamente ou retardar o processo de decomposição do β-caroteno por oxidação, revelando-se como substâncias que podem atuar positivamente no combate à oxidação de outros

compostos. A razão de velocidade de oxidação (RVO) nos fornece uma estimativa comparativa de quão rápido os compostos se degradam ao longo do tempo na presença de um determinado antioxidante comparado a uma solução controle. Quanto menor a RVO de um material, melhor será a sua atividade antioxidante, sendo desejável que a RVO seja o mais próximo de 0 (zero) quanto possível. Não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre o BHT e os extratos das folhas da TCL, no que diz respeito ao RVO, o BHT apresentou uma razão de velocidade de oxidação, aproximadamente, duas vezes menor que aquelas observadas para os extratos das folhas verdes e maduras.

Os resultados obtidos evidenciaram os extratos de folhas da TCL como uma boa fonte de compostos fenólicos e antioxidantes, sendo opções viáveis de uso quando da substituição de antioxidantes sintéticos como o BHT, considerando as constantes discussões a respeito da toxicidade destes (Bauer et al., 2001). Recomenda-se a utilização das folhas maduras no preparo de infusões devido à menor adstringência, sem perdas na capacidade antioxidante, quando comparado com as folhas verdes, onde era esperada uma maior capacidade antioxidante decorrente de uma maior presença de taninos.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

## ABSTRACT

*Antioxidant activity and phenolic content of Terminalia catappa Linn leaves at different stages of maturation*

**The total phenolic content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* Linn leaves were determined at different stages of maturation. The total phenolic content was assayed in ethanol and acidified ethanol extracts, there being no significant difference between the two ( $P>0.05$ ); the average total phenolic content was 15.77 (mg/g) and 15.41 (mg/g), for young and mature leaves, respectively, expressed in mg of catechin per g of sample. The antioxidant activity was determined by  $\beta$ -carotene/linoleic acid decomposition and expressed as antioxidant factor (AOX), ranging from 0.0140 (A/h) to 0.0767 (A/h), as antioxidant activity (AA), ranging from 0.00% to 84.92% and as oxidation rate ratio (ORR), ranging from 0.1508 to 1.0000, using BHT as a standard. The antioxidant activity of BHT and samples did not differ statistically ( $P>0.05$ ), showing the possibility of using this plant as a natural source of antioxidant compounds at both stages of maturation.**

**Keywords:** *Terminalia catappa*. Antioxidant activity, Total phenolic compounds.

## REFERÊNCIAS

Baublis A, Decker EA, Clydesdale FM. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chem.* 2000;68(1):1-6.

Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Keil K, Malkinson AM. Butylated hydroxytoluene (BHT) induction of pulmonary inflammation: a role in tumor promotion. *Exp Lung Res.* 2001;27(3):197-216.

Bobbio FO, Bobbio PA. Introdução à química de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela; 2003.

Chen PS, Li JH, Liu TY, Lin TC. Folk medicine of *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett.* 2000;152(2):115-22.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.

Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cienc Agrotecnol.* 2011;35(6):1039-42.

Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group; 2001. p. 1-7.

Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):3954-62. DOI: 10.1021/jf990146l.

Kotresha D, Naitik P, Prakash T, Rao N. Effect of *Terminalia catappa* on lipid profile in transplated fibrosarcoma in rats. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(3):390-3.

Lee SH. Phenolic compounds in foods. In: *Nollet LML. Handbook of Food Analysis: Physical characterization and nutrient analysis*. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 657-717.

Lemos AR, Rêgo Júnior NO, São José AR, Pereira MLA, Silva MV. Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011;70(1):62-68.

Lima VLAG, Mélo EA, Lima DES. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. *Braz J Food Technol.* 2004;7(2):187-90.

Lima VLAG, Mélo EA, Maciel MIS, Silva GSB, Lima DES. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). *Rev Nutr.* 2004;17(1):53-7. DOI: 10.1590/S1415-52732004000100006

Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 1968;45(9):594-598.

Marinova EM, Yanisshlieva N, Kostova IN. Antioxidative action of ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. *Food Chem.* 1994;51(2):125-32.

Mohale DS, Dewani AP, Chandewar AV, Khadse CD, Tripathi AS, Agarwal SS. Brief review on medicinal potential of *Terminalia catappa*. *J Herb Med Toxicol.* 2009;3(1):7-11.

- Nagappa AN, Thakurdesai PA, Rao NV, Singh J. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. J Ethnopharmacol. 2003;88(1):45-50.
- Opara FN, Anuforo HU, Okechuk Wu RI, Mgbemena IC, Akujobi CO, Adjero A. Preliminary phytochemical screening and antibacterial activities of leaf extracts of *Terminalia catappa*. J Emerging Trends Eng Appl Sci. 2012;3(3):424-28.
- Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. Asian Pac J Trop Dis. 2012;2(3):239-50.
- Paula AA. Caracterização físico-química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos da *Terminalia catappa* Linn. [Dissertação]. Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; 2008.
- Peterson MS, Johnson AH. Encyclopedia of food science. 2<sup>nd</sup> ed. Connecticut: Avi Publishing Co; 1978.
- Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Quím Nova. 2006;29(4):755-60.
- Saroja M, Annapoorani S. In vitro antioxidant activity of flavonoid fractions of *Cynodon dactylon* and *Terminalia catappa* leaves. Int Res J Pharm. 2012;3(8):209-11.
- Sheabar FZ, Neeman I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. J Am Oil Chem. 1988;65(6):990-3.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Júnior M, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím Nova. 2007;30(2):351-5.
- Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. J Agric Food Chem. 1999;47(5):1801-12.

Recebido em 20 de setembro de 2012

Aceito para publicação em 21 de novembro de 2012

