

## Determinação dos fenóis totais e da atividade antioxidante da *Brosimum gaudichaudii*

Determination of total phenols and antioxidant activity of *Brosimum gaudichaudii*

**COUTINHO, A.M.<sup>1</sup>; SANTOS, L.G.J.<sup>1\*</sup>; DAMASCENO, E.M.A.<sup>1</sup>; SOARES, N.Z.D.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Faculdades Integradas do Norte de Minas – Funorte, Montes Claros/ MG, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Montes Claros/MG, Brasil

**Autor correspondente:** \*Luana Gabriela de Jesus dos Santos  
Rua Porteirinha, 440 A, Bairro Esplanada, Montes Claros/MG – CEP: 39401456  
Telefone: +55 (38) 991524536  
E-mail: luanasantos.farma@hotmail.com

Recebido em 29/03/2019; Aceito em 05/04/2019

---

### Resumo

O vitiligo é uma doença de caráter autoimune, caracterizada pela despigmentação da pele, ocasionada pela perda de melanócitos. Sabe-se que a sensibilidade celular ao estresse oxidativo possui atribuições determinantes na degradação dos melanócitos. Visando reduzir os efeitos colaterais e otimizar o tratamento, terapias alternativas têm sido incorporadas, como utilização de plantas medicinais. A pesquisa empreendida propôs-se a realizar a análise do teor de fenóis totais e avaliar atividades antioxidantes da espécie *Brosimum gaudichaudii*, para mostrar sua possível eficiência no combate ao estresse oxidativo. A análise de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e a avaliação da atividade antioxidante, através do monitoramento do consumo do radical livre DPPH. A pesquisa demonstrou que a concentração de compostos fenólicos e a de atividade antioxidante da espécie analisada possui valor considerável baseando-se em outras análises da mesma espécie, entretanto inferior se comparado com outros gêneros, o que indica que a espécie tem atuação importante contra os processos oxidativos que desencadeiam o vitiligo, podendo ser uma importante aliada em seu tratamento.

**Palavras-chave:** Vitiligo. Plantas medicinais. Estresse oxidativo. Antioxidante. Melanócitos.

### Abstract

Vitiligo is a disease of an autoimmune nature, characterized by depigmentation of the skin, caused by loss of melanocytes. It is known that the cellular sensitivity to oxidative stress has attributions determinants of melanocyte degradation. Aiming to reduce side effects and optimize treatment, alternative therapies have been incorporated, such as the use of medicinal plants. The research undertaken, propose to perform the analysis of the total phenol content and antioxidant activities of the species *Brosimum gaudichaudii*, drawing a parallel in its efficiency in the treatment in oxidative stress. The analysis of total phenols was performed by the Folin-Ciocalteu method and the evaluation of the antioxidant activity through monitoring of free radical DPPH consumption. The research showed that the concentration of phenolic compounds and the curve of antioxidant activity of the analyzed species has considerable value based on the analyzes of the same species, however inferior when compared with other genera, demonstrating that the species has an important action against the oxidative processes that they trigger vitiligo, and may be an important ally in their treatment.

**Keyword:** Vitiligo. Medicinal plants. Oxidative stress. Antioxidant. Melanocytes.



## INTRODUÇÃO

Doenças autoimunes ocorrem quando o sistema imunológico ataca órgãos, tecidos ou células próprias, desencadeando um funcionamento inadequado ou provocando a destruição celular (PINTO et al., 2015).

O vitiligo é uma doença de caráter autoimune, caracterizado pela despigmentação da pele ocasionada pela perda de melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina, que acomete cerca de 1% da população mundial e 0,5% de brasileiros. Sua manifestação clínica depende do nível de desenvolvimento podendo apresentar manchas simétricas, com bordas bem definidas, ou até mesmo com uma distribuição assimétrica (TOH et al., 2018).

Embora a etiologia específica da patologia seja desconhecida, sabe-se que o distúrbio é multifatorial e culmina na perda da capacidade pigmentante dos melanócitos. Dentre estes fatores, é conhecido que a sensibilidade celular ao estresse oxidativo possui atribuições determinantes na degradação dos melanócitos (QUI et al., 2014).

Pode-se entender estresse oxidativo como uma perturbação ao equilíbrio entre as formas reativas do oxigênio geradas no metabolismo e o sistema de defesa antioxidante do organismo. No processo de estresse oxidativo em pacientes sem a patologia, ocorre a dissociação do fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear eritroide) localizado no citoplasma, das estruturas ECH tipo Kelch (keap1) e sua translocação e acúmulo no núcleo formando um complexo conjuntamente com o ARE presente em diversos genes antioxidantes e desintoxicantes, formando sinalizadores que por sua vez ativam enzimas de fase II como catalases, hemeoxinase-1 (HO-1) e superóxido desmutase que atuam contra o efeito oxidante. Foi demonstrado que pacientes com vitiligo apresentam prejuízos no processo de sinalização celular Nfr 2-ARE o que promove hipersensibilidade em insultos oxidativos bem como demonstram menor expressão de (HO-1) e transloca-

ção comprometida de Nrf-2 ao citosol. Comprovando a relação entre o estresse oxidativo e a destruição dos melanócitos (JIAN et al., 2014).

Em pacientes com vitiligo quando comparados com pacientes saudáveis pode observar que os níveis sérios de hemeoxigenase-1 (HO-1) eram inversamente proporcionais aos níveis de IL-2. Visto que a (HO-1) por meio da produção de monóxido de carbono suprime a proliferação de células T através da inibição de IL-2 (QUI et al., 2014).

Os tratamentos para o vitiligo estão relacionados ao uso de anti-inflamatórios esteroidais e imunossuppressores com o intuito de reduzir os sintomas e controlar a resposta autoimune. No entanto, estes tratamentos causam inúmeros efeitos colaterais ao organismo do paciente, desta forma outros têm sido incorporados paralelamente, a fim de aumentar o desempenho farmacológico, e até mesmo substituí-lo por manejos com redução de respostas indesejadas. Frente a este cenário, as pesquisas por alternativas com utilização de plantas medicinais apresentou crescimento considerável, gerando menor custo e uma aceitabilidade favorável por parte dos usuários (PINTO et al., 2015).

Os compostos fenólicos são um grupo de antioxidantes encontrado em diversas plantas que ajudam a combater os radicais livres com suas propriedades químicas de doar hidrogênio ou elétrons e também em razão de seus radicais intermediários estáveis (SOUSA et al., 2008). Dessa forma, plantas medicinais com um considerável teor de fenóis podem agir no retardamento da degradação dos melanócitos causada pelo estresse oxidativo, sendo uma alternativa promissora para o tratamento da enfermidade.

Sendo assim, é de fundamental importância promover estudos sobre os fenóis e suas propriedades antioxidantes uma vez que são facilmente encontrados na natureza e são acessíveis às pessoas em geral. Além disso, as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos que ajudam a combater os radicais



livres podem atuar não somente no tratamento para o vitiligo mas também na atenuação de diversas outras doenças que possivelmente estão relacionadas às formas reativas do oxigênio.

O uso de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído, passando das formas mais simplórias de tratamento local, utilizada na pré-história até as formas com maior sofisticação industrial na atualidade. A planta medicinal, colhida e usada adequadamente, diferencia-se somente do medicamento industrializado fabricado com a substância isolada, pela embalagem e por substâncias corantes, encorpanes, aromatizantes, flavorizantes, e conservantes que estão em conjunto com o princípio ativo. Associada à presença do princípio ativo, para que seja corretamente selecionada a espécie vegetal são necessárias algumas características desejáveis das plantas medicinais, como, sua eficácia, baixo risco de uso, reprodutibilidade e constância de sua qualidade (LORENZI, MATOS, 2004).

*Brosimum gaudichaudii*, é um arbusto pertencente à família *Moraceae*, comumente encontrada no cerrado, popularmente chamada por mama-cadela, conduru, maminha-de-cachorra, inharé, algodãozinho, mamica-de-cadela, amoreira-do-mato e apê, apresenta uma ampla importância na medicina popular e no âmbito industrial. A casca da raiz e do caule é utilizada no tratamento do vitiligo, onde o psoraleno e o bergapteno, ambos furanocumarinas, apresentam a ação farmacológica em conjunto com seus efeitos antioxidantes (LIMA et al., 2014).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o teor de fenóis totais e os efeitos da atividade antioxidante de *Brosimum gaudichaudii*.

## **METODOLOGIA**

A mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*) in natura com casca e madura foi colhida na safra de 2018, no mês novembro, por um produtor local da cidade de

Uberlândia/MG e transportada para o Laboratório de Bromatologia da Faculdade e Saúde Ibituruna (FASI), onde foram lavadas em água corrente e deixadas para secar sob folhas de papel toalha para retirada do excesso de água.

Para o preparo do extrato, foram pesadas 500 g de cascas secas. A maceração foi realizada pela extração em 500 mL de etanol por 7 dias, em temperatura ambiente. Logo após, os extratos foram filtrados em papel-filtro. As alíquotas dos extratos etanólicos foram rotaevaporados sob pressão reduzida a  $50 \pm 1,0$  °C em rotaevaporador rotativo, obtendo-se os extratos brutos concentrados. Em seguida, os extratos brutos foram dissolvidos em solução etilica 70%, para serem utilizados nos ensaios de atividade antioxidante.

### **Determinação de Fenóis Totais**

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Química Tecnológica da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), onde o teor de fenóis totais dos extratos foi analisado, utilizando ácido gálico como padrão pelo método de Folin-Ciocalteu que, com modificações. A solução etanólica do extrato das cascas do caule (2,5 mg mL<sup>-1</sup>) foi preparada. A cada tubo, misturou-se 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água 1:1), 500 µL de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e 4 mL de água destilada. As soluções foram incubadas no escuro à temperatura ambiente durante 25 min. A absorvância da amostra foi lida frente ao branco a 725 nm usando um espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP220). O teor de fenóis totais (FT) dos extratos foi determinado por comparação com uma curva de calibração de ácido gálico, como um padrão cuja concentração de Abs = 0,0628 x (Conc Ácido Gálico, µg mL<sup>-1</sup>) - 0,0521, r<sup>2</sup> = 0,9973 e representadas como equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG). As análises foram realizadas em triplicata.

### **Determinação da Atividade Antioxidante**

#### **Método do DPPH**



Primeiramente, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 515 nm de todas as soluções (1 a 40 µg/mL), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o metanol. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1 min entre cada leitura. A Equação da curva de calibração do DPPH foi  $C = 35,846A - 0,230$ , onde C corresponde à concentração de DPPH no meio, A é a absorbância medida no comprimento de onda de 516 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,9997$ .

Leitura das medidas de absorbância nas amostras Soluções dos extratos EtOH (500 µg/mL) e dos controles positivos em metanol foram diluídas nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 515 nm, no 1º, 5º e 10º min, a cada 10 min até completar 1 h. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPHREM), conforme a Equação:  $\%DPPHREM = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100$  onde  $[DPPH]_{T=t}$  corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato e  $[DPPH]_{T=0}$  é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 mg/mL (100 µmol/mL)<sup>12,13,21</sup>. A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE50), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra

(µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHREM) 13. Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação:  $\%AA = \frac{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100}{Abs_{controle}}$  onde  $Abs_{controle}$  é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH e  $Abs_{amostra}$  é a absorbância da mistura reacional (DPPH+amostra)<sup>22,23</sup>.

A análise estatística dos resultados apresentados neste estudo corresponde à média de três repetições ( $n=3$ ) ± desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $P < 0,05$ ). Os coeficientes de correlação foram determinados entre o conteúdo de fenóis totais e a concentração eficiente de cada extrato, CE50. Todas as análises foram realizadas usando o programa Microcal Origin 7.5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O vitiligo é uma das principais doenças dermatológicas existentes, tendo vários fatores associados à etiopatogenia da doença. Desde hereditariedade a imunidade e fatores ambientais. Estudos recentes evidenciaram a relação da doença com o estresse oxidativo em razão dos radicais livres produzidos no processo de síntese de melanina, com consequente degradação dos melanócitos, por uma irregularidade no mecanismo de defesa antioxidante (ONGENAE et al., 2003).

Sendo assim, trabalhar em aumentar a defesa antioxidante do organismo constitui um método promissor para o tratamento da patologia.

Segundo MOSER et al., (2019) antioxidantes são substâncias com a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de lipídios dentre outras moléculas, evitando

o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. Esta atividade em compostos fenólicos ocorre devido às suas atividades de óxido-redução, que desempenham ação na absorção, sequestro e neutralização de radicais livres, formando produtos estáveis.

A atividade antioxidante da mama-cadela do presente estudo foi de 26,46%, a mesma análise demonstrada por LAND et al (2017). resultou no valor de  $28,85 \pm 2,66$ . MOSER et al (2019). demonstraram que a atividade antioxidante na amora-preta foi de  $29,52 \pm 3,86$  g de amostra g-1 DPPH. Comparando com o estudo de Costa et al. com a análise da uva Isabel precoce de 10219 g de amostra g-1 DPPH.

LIMA et al., (2014) relata em seu estudo a presença de efeitos antioxidantes na casca da raiz e do caule da mama-cadela e devido esta atividade ela é utilizada no tratamento do vitiligo.

CORDEIRO, (2018) relata que o extrato obtido a partir dos tubérculos torrados de *Alocasia macrorrhizos* apresentou atividade antioxidante demonstrando, dessa forma, a efetividade promissora da referida planta na opção no tratamento do vitiligo.

Os compostos fenólicos comportam-se como antioxidantes tanto por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, quanto por seus radicais intermediários estáveis, que impossibilitam a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de ácidos graxos e de óleos. Tendo assim, contribuição na dieta bem como na prevenção de enfermidades por meio desta (SOUSA et al., 2008).

Os compostos fenólicos da mama-cadela do presente estudo foram de 44,30 mg EAG/100 g, inferiores aos estudos de LAND et al. (2017)  $46,47 \pm 0,73$  com a mesma espécie.

**Tabela 1.** Fenóis totais presentes na espécie analisada comparados aos valores obtidos em outros estudos.

Amostra analisada	Fenóis totais em mg EAG/100 g
Mama-cadela	44,30
Amostras analisadas em outros estudos	Fenóis totais em mg EAG/100 g
Mama-cadela	$46,47 \pm 0,73$
Juçara não sombreada	$6727 \pm 140,3$
Juçara sombreada	$12448 \pm 273,4$
Amora Preta	$1,32 \pm 0,01$
Goiaba	159,8
Mamão	88,1
Manga	59,8
Cascas da uva Isabel e Niágara	219,56 a 1.242

**Tabela 2.** Atividade antioxidante presente na amostra analisada comparada ao percentual obtido em outros estudos.

Amostra analisada	Atividade Antioxidante
Mama-cadela	26,46
Amostras analisadas em outros estudos	Atividade Antioxidante
Mama-cadela	$28,85 \pm 2,66$
Amora preta	$29,52 \pm 3,86$



## CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a espécie analisada possui valores consideráveis de fenóis totais e ação antioxidante comparada com as demais pesquisas neste segmento. Sendo essas substâncias possíveis medidas para o melhoramento do quadro clínico do paciente portador de vitiligo, visto que o estresse oxidativo possui atribuições determinantes na degradação dos melanócitos e na despigmentação e os efeitos antioxidantes podem atenuar esse estresse.

## REFERÊNCIAS

- COSTA, R.R.; FERREIRA, T.O.; RODRIGUES, A.A.M.; NASCIMENTO, J.H.B.; LIMA, M.A.C. Composição fenólica e atividade antioxidante da uva Isabel Precoce sob influência de épocas de produção do ano e sistemas de condução. *Embrapa Semiárido*, v. 284: 221-227, 2019.
- CORDEIRO, I.H. Bioatividade dos extratos de *Alocasia macrorrhizos* em cultura de células e modelo murino de vitiligo [dissertação mestrado]. [Teófilo Otoni (MG)]: Programa de Pós-graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2018. 61 p.
- FILHO, A.C.P.M.; FILHO, J.G.O.; CHRISTOFOLI, M.; SOUZA, C. F.C. Atividade antioxidante e compostos bioativos em espécies de um fragmento de Cerrado goiano tipo cerradão. *Colloquium Agrariae*, 15(1): 1-8, 2019.
- FILHO, R.F.C.; NAVAIS, R.; GONÇALVES, E.M. Características físico-químicas e fenóis totais em frutos de juçara em diferentes condições ambientais. *Revista Agro@mbiente Online*, 11(4): 331-335, 2017.
- JIAN, Z.; LI, K.; SONG, P.; ZHU, L.; CUI, T.; LIU, B.; TANG, L.; WANG, X.; GAO, T.; LI, C. Impaired activation of the Nrf2-ARE signaling pathway undermines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress response: a possible mechanism for melanocyte degeneration in vitiligo. *Journal of investigative dermatology*, v. 134: 2221-2230, 2014.
- LAND, L.R.B.; BORGES, F.M.; BORGES, D.O.; PACOAL, G.B. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos da mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc) proveniente do Cerrado Mineiro. *Demetra: alimentação, nutrição & saúde*, 12(2), 2017.
- LIMA, M.R.; SANTOS, P.D.A.; SILVEIRA, C.E.S.; PALHARES, D.; PEREIRA, L.A.R. In vitro cultivation of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (*Moraceae*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(2): 462-466, 2014.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, São Paulo, 2002, 512 p.
- MICHILES, E. Diagnóstico situacional dos serviços de fitoterapia no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(01): 16-19, 2004.
- MOSER, C.D.S.; UBERTI, A.; BORSOI, F.T.; LUGARES, A.; BAGATINI, M.D.; GIACOBBO, C.L. Caracterização de compostos bioativos e atividade antioxidante de amora-preta produzidas no oeste de Santa Catarina. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 10, n. 2, 2019.
- ONGENAE, K.; VAN GEEL, N.; NAEYAERT, J.M. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Research*, 16(2): 90-100, 2003.
- PINTO, M.; BANI, G.; PAIVA, P. Mecanismo de indução de tolerância oral no tratamento de doenças autoimunes. *Revista da UIIPS*, 3(2): 2015.
- QUI, L.; SONG, Z.; SETALURI, V. Oxidative Stress and Vitiligo: The Nrf2-ARE Signaling Connection. *Journal of investigative dermatology*. v. 134: 2074-2076, 2014.
- SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. *Rev. Bras. Frutic.*, v. 30(1): 59-64, 2008.
- SOUSA, C.D.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.D.; ARAÚJO, D.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, Terezina, 30(2): 351-355, 2007.
- TOH, J.J.H.; BHOI, S.; TAN, V.W.D.; CHUAH, S.Y.; JHINGAN, A.; KONG, A.W.K.; THNG, S.T.G. Automated scoring of vitiligo using superpixel-generated computerized digital image analysis of clinical photographs: a novel and consistent way to score vitiligo. *British Journal of Dermatology*, v.179 (1): 220-221, 2018.
- VIEIRA, L.M.; CASTRO, C.F.S.; DIAS, A.L.B.; SILVA, A.R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (*Anacardiaceae*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, 17(4): 521-527, 2015.