UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

RAFAEL SARI

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Tabernaemontana catharinensis* E AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS DIABÉTICOS

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO
2018

RAFAEL SARI

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Tabernaemontana catharinensis* E AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de "Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos" – Área de conhecimento: Alimentos.

Professor Orientador: Dr. Gustavo Roberto Thomé
Professor Co-orientador: Dra. Solange Teresinha Carpes

PATO BRANCO
2018

S245o Sari, Rafael.
Otimização da extração de compostos fenólicos das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* e avaliação dos marcadores de extresse oxidativo em ratos diabéticos / Rafael Sari. – 2018.
95 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Roberto Thomé
Coorientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2018.
Bibliografia: f. 80 - 91.

1. Fenóis. 2. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 3. Antioxidantes. 4. Extração (Química). I. Thomé, Gustavo Roberto, orient. II. Carpes, Solange Teresinha, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

TERMO DE APROVAÇÃO Nº 78

Título da Dissertação

Otimização da extração de compostos naturais das folhas de (Tabernaemontana catharinensis) e avaliação antioxidante sob o modelo experimental de diabetes

Autor

Rafael Sari

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas do dia 24 de setembro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Gustavo Roberto Thomé
UTFPR/PB
Orientador

Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni
UTFPR/PB
Examinadora

Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini
UFFS/Chapecó
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele o caminho seria mais difícil, sua companhia me fortalece, me da paz, força e sabedoria.

Aos meus pais Valdocir Pedro Sari e Beloni Mazzonetto Sari por todo o amor, carinho, paciência e dedicação, por sempre acreditarem em mim e fazerem do meu sonho seus sonhos, obrigado pelo amparo e pelo carinho, obrigado por tudo, vocês são meus maiores exemplos.

Agradeço também ao meu irmão Robson Sari e minha cunhada Elisandra Regina Grassi Sari e em especial ao meu querido afilhado Pedro Lucas Grassi Sari, por todo o apoio, companheirismo, amizade e incentivo.

Bem como, agradeço também a minha irmã Francielly Sari Perusso e ao meu cunhado Diego Carlos Perusso e em especial a minha querida afilhada Maria Valentina Perusso, pela amizade, incentivo e por sempre estarem presentes nesta caminhada.

Agradeço também ao meu orientador Gustavo Roberto Thomé e minha coorientadora Solange Teresinha Carpes, por não medirem esforços para que este projeto desse certo, pela orientação dada e pela confiança depositada sobre mim para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa, em especial a Luana Bertoleti, Maiara Zanoelo, Paula Conterno e Leticia Dangui, pelas risadas, companheirismo e ajuda. Obrigado pelos finais de semana maravilhosos rodeados de análises e companheirismo.

À todos os meus amigos, agradeço pela amizade, os quais foram companheiros em todos os momentos e em especial agradeço a minhas amigas Jéssica Bordim, Anne Raquel Sotilles, Suelen dos Santos, Carla Cristina Lise e Jéssica Stadniki.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR - Pato Branco e a Faculdade de Pato Branco – FADEP agradeço ao espaço cedido para que eu pudesse realizar as atividades demandadas por este trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pelos ensinamentos passados.

Às responsáveis pela limpeza dos laboratórios agradeço por sempre manterem os laboratórios limpinhos e organizados.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

SARI, Rafael. Otimização Da Extração De Compostos Fenólicos Das Folhas De Tabernaemontana Catharinensis e Avaliação Dos Marcadores De Estresse Oxidativo Em Ratos Diabéticos. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

Tabernaemontana catharinensis (*T. catharinensis*) é uma planta medicinal da flora brasileira a qual se destaca por apresentar alto potencial antioxidante. A planta é conhecida popularmente como cobrina e suas folhas, cascas e raízes são empregadas no combate a doenças relacionadas com estresse oxidativo tais como as gastroenterites, a sífilis e a hanseníase. O objetivo do presente estudo foi otimizar a extração de compostos fenólicos de *T. catharinensis* utilizando delineamento fatorial 2^3 variáveis solventes (Etanol e Acetato de Etila), tempo (30 e 60 minutos) e temperatura(35^0 e 65^0 C) para posteriormente analisar as atividades antioxidantes *in vitro* e o efeito sob o estresse oxidativo no modelo experimental animal de diabetes. Na avaliação da capacidade antioxidante *in vitr*o foi determinado o poder de sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácidosulfônico) (ABTS), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), e oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico. No modelo experimental animal de diabetes foram determinados: a peroxidação lipídica (TBARS), catalase (CAT), glutationa s-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) nos tecidos de fígado, rim, baço e cérebro total de ratos Wistar. A caracterização e quantificação do perfil de compostos fenólicos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o conjunto de dados foi analisado pela metodologia de superfície de resposta e análise dos componentes principais (PCA). Utilizando o extrato A8 o qual foi a melhor condição de extração para as determinações, *in vitro* e *ex vivo,* foi utilizado. Os resultados demonstram que o solvente etanol foi mais eficiente na extração dos compostos fenólicos da *T. catharinensis* incorporado à maior temperatura (65 ^{0}C) e tempo (60 min). O solvente acetato de etila majoritariamente extraiu o composto fenólico pinocembrina o qual possui característica de extração em menor polaridade utilizando a temperatura de 65 ^{0}C e o tempo de 60 min. Os

resultados *in vitro* demonstraram que o extrato A8 possui ação antioxidante satisfatória com 23,34 mg de EAG/g^{-1} para CFT, 34,26 µmol de Trolox para DPPH, 24,13 µmol Fe^{2+} para FRAP, 12,57 µmol Trolox para ABTS e 78,85 AA% para o β-caroteno/ácido linoleico. Os resultados dos marcadores de estrese oxidativo em ratos diabéticos demonstraram que o extrato A8 das folhas de *T. catharinensis* administrado via gavagem em ratos diabéticos diminuiu a atividade da GST no fígado e da SOD no cérebro total. Conclui-se que a metodologia desenvolvida para a extração dos compostos fenólicos das folhas da *T. catharinensis* é promissora e apresenta potencial antioxidante *in vitro* satisfatório, porém a utilização do extrato A8 da planta para combater o estresse oxidativo no modelo experimental animal de diabetes não demonstrou ser eficiente e requer estudos adicionais para aplicação como antioxidante em atividades biológicas.

Keywords: compostos fenólicos, cromatografia líquida de alta eficiência, planejamento fatorial, Tabernaemontana catharinensis.

ABSTRACT

SARI, Rafael. Optimization of Phenolic Compound Extraction from Tabernaemontana Catharinensis Leaves and Evaluation of Oxidative Stress Markers in Diabetic Mice. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

Tabernaemontana catharinensis (T. catharinensis) is a medicinal plant of the Brazilian flora which stands out for its high antioxidant potential. The plant is popularly known as blancule and its leaves, barks and roots are used to combat diseases related to oxidative stress such as gastroenteritis, syphilis and leprosy. The objective of the present study was to optimize the extraction of phenolic compounds from *T. catharinensis* using a factorial design of 23 solvent variables (Ethanol and Ethyl Acetate), time (30 and 60 minutes) and temperature (350 and 650 ^{0}C) to later analyze the activities antioxidants in vitro and the effect under oxidative stress in the animal experimental model of diabetes. In the evaluation of the in vitro antioxidant capacity the sequestering power of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis- (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) radicals was determined ABTS), antioxidant iron reduction power (FRAP), and oxidation of the β-carotene / linoleic acid system. In the animal experimental model of diabetes, lipid peroxidation (TBARS), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) were determined in liver, kidney, spleen and total brain tissues of Wistar rats. The characterization and quantification of the profile of phenolic compounds were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the data set was analyzed by response surface methodology and principal component analysis (PCA). Using extract A8 which was the best extraction condition for the determinations, in vitro and ex vivo, was used. The results demonstrate that ethanol solvent was more efficient in extracting the phenolic compounds of *T. catharinensis* incorporated at higher temperature (65 ^{0}C) and time (60 min). The solvent ethyl acetate mostly extracted the phenolic compound pinocembrina which has characteristic of extraction in less polarity using the temperature of 65 ° C and the time of 60 min. In vitro results demonstrated that the A8 extract has a satisfactory antioxidant action with 23.34 mg EAG / g^{-1} for CFT, 34.26 µmol Trolox for DPPH, 24.13 µmol Fe^{2+} for FRAP, 12.57

μmol Trolox for ABTS and 78.85% AA for β-carotene / linoleic acid. The results of oxidative stress markers in diabetic rats demonstrated that the A8 extract from the leaves of T. catharinensis administered via gavage in diabetic rats decreased GST activity in the liver and SOD in the whole brain. It is concluded that the methodology developed for the extraction of the phenolic compounds from the leaves of *T. catharinensis* is promising and has a satisfactory in vitro antioxidant potential. However, the use of the plant extract A8 to combat oxidative stress in the experimental animal model of diabetes did not demonstrate be efficient and requires additional studies for application as an antioxidant in biological activities.

Keywords: phenolic compounds, high performance liquid chromatography, factorial design, *Tabernaemontana catharinensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas de *Tabernaemonta catharinensis*. 22
Figura 2 - Estrutura do Ácido fenólico 23
Figura 3 - Estrutura básica de flavonoides 24
Figura 4 - Estrutura dos antioxidantes natural vitamina C (a) e sintético BHA (b) BHT (c) 24
Figura 5 - Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico 26
Figura 6 - Reação de oxirredução do radical ABTS 27
Figura 7 - Redução do complexo $Fe3^{+}$ a Fe^{2+} 27
Figura 8 - Estrutura do β-caroteno 28
Figura 9 - Fluxograma das Atividades Desenvolvidas 31
Figura 10 - Gráfico de Pareto para *T. catharinensis* e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (1a) e atividade antioxidante (1b). 44
Figura 11 A,B,C - Gráficos de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos. 45
Figura 12 A,B - Gráficos de Superfície referente à resposta Atividade antioxidante DPPH. 46
Figura 13 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração da quercetina. 52
Figura 14 - Gráfico de Superfície referente à resposta compostos fenólicos Quercetina. 53
Figura 15 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração da rutina. 54
Figura 16 - Estrutura da rutina. 55
Figura 17 - Gráfico de Superfície referente à resposta compostos fenólicos Rutina. 56
Figura 18 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração do ácido ferúlico. 57
Figura 19 - Estrutura do ácido ferúlico. 58
Figura 20 - Gráfico de Superfície referente à resposta compostos fenólicos ácido ferúlico. 59
Figura 21 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração do ácido cumárico. 60

Figura 22 - Gráfico de Superfície referente à resposta compostos fenólicos ácido cumárico. 61
Figura 23 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração da pinocembrina. 62
Figura 24 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos pinocembrina. 64
Figura 25 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para resposta global. 65
Figura 26 - Gráfico de superfície referente à resposta global. 66
Figura 27 - Gráfico de PCA: Efeitos de fatores de tempo e temperatura na conversão de compostos fenólicos: a) pontuações b) gráfico de carga para compostos fenólicos. 67
Figura 29 a-d - Atividade da peroxidação lipídica (TBARS) nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6). Os resultados são expressos em nmol MDA/ g de tecido. 74
Figura 30 a-d - Atividade da atividade enzimática da glutationa S-transferase nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6). 76
Figura 31 a-d - Gráficos da atividade enzimática da superóxido dismutase nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6). Os resultados são expressos em nmol/mg de proteína. 78
Figura 33 - Cromatogramas dos extratos das folhas de *T. catharinensis*. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento Fatorial 33
Tabela 2 - Condições e Variáveis utilizadas no delineamento fatorial.....33
Tabela 3 - Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG g -1) e AA (µmol Trolox g-1) em extratos de folhas de T. catharinensis.....42
Tabela 4 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes CFT em extratos das folhas de T. catharinensis. 42
Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes AA em extratos das folhas de T. catharinensis. 43
Tabela 6 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores; solvente, tempo e temperatura. 44
Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos expressos em (µg/g) por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos das folhas de Tabernaemontana catharinensis. 48
Tabela 8 - Análise da resposta de variância dos compostos fenólicos de *T. catharinensis* submetidos a tratamentos de acordo com (Factorial Design).. 51
Tabela 9 - Atividade antioxidante da melhor condição de extração. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T. catarinensis	*Tabernaemontana catarinensis*
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ABTS	2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
NPSH	Grupamentos tióis não-protéicos
CAT	Enzima catalase
SOD	Enzima superóxido dismutase
CFT	Compostos fenólicos totais
GST	Glutationa S-transferase
AA	Atividade antioxidante
TCCF	Tabernaemontana catharinensis/Compostos Fenólicos
TCDPPH	Tabernaemontana catharinensis/DPPH

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Porcentagem de inibição relativa em relação ao controle. 35
Equação 2 - TCCF 44
Equação 3 - TCDPPH 44
Equação 4 - Equação garada para quercetina 52
Equação 5 - Equação gerada para rutina. 54
Equação 6 - Equação gerada para o ácido ferúlico 57
Equação 7 - Equação gerada para ácido cumárico 60
Equação 8 - Equação gerada para pinocembrina. 63
Equação 9 - Equação gerada para a resposta global. 65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **17**
2 OBJETIVOS **19**
2.1 Objetivo geral 19
2.2 Objetivos específicos 19
3 REFERENCIAL TEÓRICO **20**
3.1 *Tabernaemontana catharinensis* 20
3.2 Compostos bioativos com propriedades terapêuticas 21
3.3 Atividade antioxidante *in vitro* 23
3.3.1 Compostos fenólicos 24
3.3.2 Atividade antioxidante $DPPH^{\bullet}$ 25
3.3.3 Atividade antioxidante $ABTS^{\bullet+}$ 25
3.3.4 Atividade antioxidante FRAP 26
3.3.5 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico 27
4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTES *EX VIVO* NO MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE DIABETES **27**
4.1*. Catalase* 28
4,2. Superóxido Dismutase 29
4,3 Glutationa S-transferase 29
5. MATERIAIS E MÉTODOS **30**
5.1 Obtenção das folhas de Tabernaemontana catharinensis 30
5.2 Processamento das folhas de Tabernaemontana catharinensis 31
5.3 Extração de dompostos naturais de *T. catharinensis* e deliniamento fatorial 31
5.4 Determinações de compostos fenólicos totais método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau 33
5.5 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO* **33**
5.5.1 Atividade de sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$ 33
5.5.2 Atividades antioxidantes pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico 34
5.5.3 Atividade antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$ 35
5.5.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP 35

6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE 36
7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 36
7.1 Animais.....36
7.2 Aspectos Éticos.....37
7.3 A indução da diabetes.....37
7.4 O tratamento 38
7.5 Os grupos do modelo experimental.....38
8 ANÁLISES ANTIOXIDANTES *EX VIVO*.....38
8.1 Ensaio da enzima superóxido dismutase 38
8.2 Ensaio da nzima catalase.....39
8.3 Determinação da peroxidação lipídica 39
8.4 Determinação da glutationa S-transferase 40
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
9.1 Otimização via compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante DPPH 40
9.1.2 Teor de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante DPPH 40
9.2 **OTIMIZAÇÃO VIA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)** 46
9.2.1 Identificação E Quantificação Dos Compostos Fenólicos 46
9.2.2 Quercetina.....51
9.2.3 Rutina.....53
9.2.4 Ácido Ferulico.....56
9.2.5 Ácido Cumárico 59
9.2.6 Pinocembrina 61
9.2.7 Resposta Global.....64
1**0 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DA MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO (EXTRATO A8)** 68
11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EX VIVO EM MODELO ANIMAL DE DIABETE .70
12 CONCLUSÃO 78
13 REFERÊNCIAS.....80
14 ANEXOS 92

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas pelos seres humanos para fins nutricionais e medicinais é tão antiga quanto à própria humanidade. As propriedades fitoquímicas de extratos de plantas podem ser empregadas para o tratamento de doenças, as quais representam o ponto de partida para a descoberta de diferentes substâncias bioativas com potencial terapêutico. De fato, a natureza, acompanhada da sua grande variabilidade de espécies, consiste em fonte expressiva de compostos químicos conhecidos por metabólitos especializados ou fitoquímicos com grande potencial no desenvolvimento de novas drogas (Brusotti et al., 2014; Jamwal et al., 2017).

Os fenólicos são compostos fitoquímicos os quais se apresentam como um dos grupos mais importantes e onipresentes em alimentos naturais provenientes de frutas e plantas os quais possuem aplicações benéficas à saúde do homem contendo ações antimicrobianas, anticancerígenas e antioxidantes (Fratoddi et al., 2018).

No Brasil, a enorme biodiversidade reflete a riqueza da flora brasileira em que as plantas e seus compostos apresentam-se como terapia alternativa na medicina atual e podem ser consumidas e utilizadas para fins terapêuticos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 80% da população faz uso de plantas medicinais com cunho curativo e como alternativa de melhora no estado doentio sem qualquer comprovação cientifica, por isso, é necessário uma crescente demanda nos estudos que buscam a identificação de novos compostos fitoquímicos os quais apresentem ação terapêutica em inúmeras patologias tais como a hipertensão, Alzheimer e o Diabetes (Gindri et al., 2011; Negri, 2005).

Algumas espécies de plantas medicinais são utilizadas experimentalmente para tratar patologias tal como a *Tabernaemontana catharinensis* (*T. catharinensis*) do gênero Tabernaemontana que pertence à família Apocynaceae e consiste em arbustos floridos amplamente utilizados na medicina popular (Marinho et al., 2016; Belke et al., 2011). A *T. catharinensis* pode ser encontrada no Brasil, Argentina e no Paraguai a qual é popularmente conhecida como “cobrina”, “jasmim” e “leiteira de dois irmãos”, e suas folhas, cascas e raízes são empregadas contra desarranjos

intestinais, sífilis, hanseníase e picadas de mosquitos. Os extratos de suas sementes, folhas, cascas e raízes apresentaram alta atividade anti-inflamatória e analgésica em estudos realizados por Soares et al., 2007; Boligon et al., 2014; Brum et al., 2016).

A importância farmacológica da espécie já descrita na literatura fornece informações preliminares sobre o enorme potencial do extrato de *T. catharinensis* que estimula estudos sobre a otimização de extração dos compostos fenólicos e atividades antioxidantes. O processo de extração visa melhorar a metodologia de experimentação no qual avalia a influência de diferentes fatores como o solvente, o tempo e a temperatura analisados pela metodologia de superfície de resposta e pelo conjunto de dados por análise de componentes principais (ACP) e pela resposta global. A melhor condição de extração definida por estas análises é parâmetro importante para o próximo passo do trabalho que estuda a aplicação biológica da planta no modelo experimental animal de Diabetes avaliando sob os marcadores de estresse oxidativo.

Nesse sentido o presente estudo tem como objetivo central a otimização da extração dos compostos fenólicos presentes nas folhas da planta *T. catharinensis* e posteriormente a verificação do potencial antioxidantes *in vitro* bem como sua atuação nos marcadores de estresse oxidativo *ex vivo* em modelo experimental animal de Diabetes

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivos otimizar a extração de compostos fenólicos da planta *T. catharinensis* e posteriormente verificar o potencial antioxidantes *in vitro* bem como sua atuação nos marcadores de estresse oxidativo *ex vivo* em modelo experimental animal de Diabetes.

2.2 Objetivos específicos

1. Otimizar a extração de compostos fenólicos das folhas de *T. catharinensis;*
2. Avaliar/quantificar o extrato de *T. catharinensis* quanto ao teor de fenólicos totais e sequestro do radical DPPH;
3. Identificar/quantificar os compostos fenólicos de *T. catharinensis* por Cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD).
4. Determinar as atividades antioxidantes *in vitro* DPPH, FRAP, ABTS e auto oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico;
5. Avaliar a peroxidação lipídica (TBARS) *ex vivo* em fígado, rim, baço e cérebro total de ratos diabéticos submetidos ao tratamento com extrato obtido a partir da melhor condição de extração das folhas de *T. catharinensis*;
6. Avaliar as atividades enzimáticas catalase, superóxido dismutase e glutationa S-transferase em fígado, rim, baço e cérebro total de ratos diabéticos submetidos ao tratamento com extrato otimizado das folhas de *T. catharinensis*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Tabernaemontana catharinensis*

As plantas são amplamente utilizadas como fármacos por quase todas as culturas mundiais com objetivo de prevenir, tratar e curar vários tipos de patologias. Porém, os produtos derivados das plantas muitas vezes são utilizados com equívoco os quais podem apresentar efeitos tóxicos ou adversos. Por tal razão, é fundamental investigar as ações biológicas das plantas medicinais para confirmar sua eficácia ao combate de doenças (BRUM et al., 2016).

Inúmeras plantas são utilizadas com cunho curativo e entre elas destaca-se a *T. catharinensis* (Figura 1) que possui de 3 a 10 m de altura e faz parte da família *Apocynaceae* popularmente conhecida como “jasmim”, “leiteira de Dois Irmãos” ou “cobrina”. Esta espécie pode ser encontrada nas regiões da Argentina, Uruguai, Paraguai e no Sul do Brasil. Estudos que envolvem membros desta família comprovam a vasta quantidade de alcaloides que desempenham ação protetora contra fungos bactérias, insetos e herbivoros (PEREIRA et al., 2006; MARINHO et al., 2016).

Os alcaloides extraidos e identificados de *T. catharinensis* tais como a ibogamina, a voacangina e a coronaridina são compostos bioativos valiosos e apresentam atividades biológicas importantes tais como antitumorais, antiinflamatórias, análgesicas, anticancerígenas, antioxidantes, antibacteriana e principalmente atividade contra leishmaniose, o que demostra grande potencial terapêutico para inúmeras patologias (PEREIRA et al., 2006; MARINHO et al., 2016). Importante salientar que o extrato da casca da *T. catharinensis* neutraliza a letalidade e a toxicidade do veneno da serpente Crotalus *durissus* (cascavel sul-americana) a qual ação é atribuída pela presença de alcaloides indólicos (GOMES et al., 2009). Na medicina popular *T. catharinensis* é utilizada como antídoto para injúriasodontológicas e ótimo eliminador de verrugas (PEREIRA et al., 2006).

As plantas medicinais em sua maioria apresentam alcaloides do tipo indólicos os quais são substâncias derivadas do metabolismo do triptofano e

caracterizam-se por apresentar um núcleo indol o qual é um anel benzênico acoplado a um anel pirrol ou um derivado (NICOLA, 2013).

Além dos alcaloides, o extrato dos frutos e dos ramos de *T. catharinensis* apresentam compostos bioativos do tipo fenólicos tais como rutina, ácido cafeico e ácido clorogênico. Esses polifenóis contribuem com a capacidade antioxidante da planta e pode combater o estresse oxidativo gerado em inúmeras doenças (PIANA et al., 2014).

Embora já tenham sido realizados estudos sobre a *T. catharinensis* (Figura 1) a avaliação da atividade biológica e dos compostos bioativos da planta em extratos otimizados ainda são escassos.

Figura 1 - Folhas de *Tabernaemonta catharinensis*.
Fonte: Do autor.

3.2 Compostos Bioativos Com Propriedades Terapêuticas

Atualmente, tem-se verificado grande avanço científico em relação aos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais os quais representam alternativa viável para a busca de novos compostos fitoquímicos que possuem propriedades terapêuticas (YUNES et al., 2001).

As propriedades terapêuticas de compostos antioxidantes representam uma importante classe de bioativos os quais são estruturas químicas muito diversas com propriedades comuns, ou seja, moléculas que impedem a oxidação de outras

moléculas. Esta ação dos antioxidantes pode ocorrer por diferentes mecanismos: agir como doadores de elétrons, reduzir espécies reativas de oxigênio, complexar transições de íons metálicos ou regenerar outros antioxidantes (RENARD, 2018).

O consumo frequente destes compostos antioxidantes exógenos naturais podem retardar doenças ligadas ao estresse oxidativo por ajudar na inibição de formação de radicais livres. O estresse oxidativo está correlacionado com o desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante que causa dano oxidativo frequentemente relacionado com um grande número de patologias incluindo doenças cardiovasculares, câncer e o diabetes (SILVA et al., 2011).

Os antioxidantes além de contribuírem para a inibição de patologias causadas pelo estresse oxidativo também são amplamente utilizados na indústria alimentícia o qual podem ser de fontes sintéticas ou naturais, e evitam a degradação de produtos. No entanto, "antioxidante" tornou-se um termo familiar para enorme diversidade de moléculas vegetais naturais com potencial de prevenção de doenças degenerativas tal como o Diabetes. A diversidade de moléculas antioxidantes presentes em plantas inclui as vitaminas C e E, a provitamina A e outros carotenóides e polifenóis.

Os polifenóis são metabólitos secundários presentes nas folhas e frutos de plantas e sua função primária é de proteção. A sua estrutura é composta de um anel aromático contendo um ou mais substituintes hidroxila juntos com vários outros grupos secundários, como os ácidos fenólicos (Figura 2) (REITZER et al., 2018; CHANDRASEKARA et al., 2018).

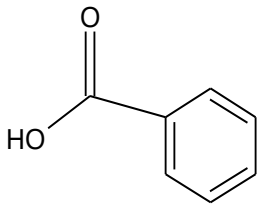


Figura 2 - Estrutura do Ácido fenólico
Fonte: Adaptado BRAVO, (1998).

Os flavonóides são um grupo de substâncias de baixo peso molecular, biossintetizados a partir de derivados de ácidos acéticos/fenilalanina por meio da via do ácido chiquímico (WANG et al., 2018). Alguns desses compostos possuem fins bioquímicos e farmacológicos com ações antioxidantes, anti-inflamatória, antialérgicos e apresentam estrutura química básica constituída de 15 carbonos

distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), os benzenos, interligados a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), onde o primeiro benzeno é condensado com o sexto carbono do pirano, que na posição dois carrega um grupo fenila (Figura 3) (RODRIGUES et al., 2015).

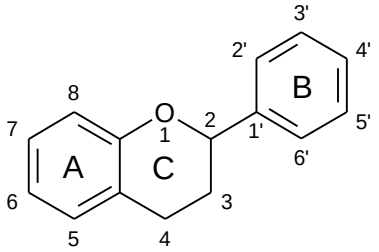


Figura 3 - Estrutura básica de flavonoides
Fonte: Adaptado BRAVO, (1998).

3.3 Atividade Antioxidante *In Vitro*

Segundo a ANVISA os antioxidantes são definidos como substâncias que retardam ou diminuem a velocidade de oxidação dos alimentos através de um ou mais mecanismos tais como a inibição de radicais livres e a complexação de metais (EVANGELISTA, 2009).

Os antioxidantes vitamina C (Figura 4a), vitamina Ee os carotenoides podem ser gerados de fontes naturais e serem inseridos nos suplementos dietéticos para aumentar o tempo de conservação. No entanto, os antioxidantes mais utilizados na indústria com função de preservação dos alimentos são de origem sintética tal como o hidroxianisol butilado (BHA) (Figura 4b) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (Figura 4c) (MESSIAS, 2009).

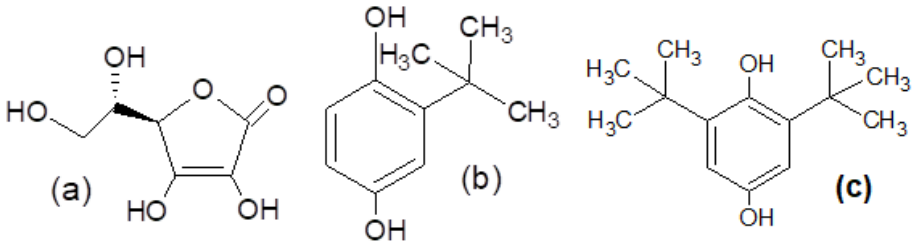


Figura 4 - Estrutura dos antioxidantes natural vitamina C (a) e sintéticos BHA (b) BHT (c)
Fonte: Adaptado FLEMMING (2011).

A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais se faz necessário devido às implicações que estes causam a saúde e na funcionalidade do corpo humano (RAMALHO et all., 2006). A utilização de antioxidantes naturais possui larga vantagem quando comparado com os antioxidantes sintéticos, aqueles possuem maior apelo preservacionista, pois os resíduos que sobram das indústrias tais como cascas e sementes são fontes naturais de compostos antioxidantes e frequentemente descartadas sem apropriado uso. Desse modo, os resíduos industriais podem ser mais bem reaproveitados com inúmeras aplicações na indústria alimentícia e na saúde humana favorecerendo tanto o homem no combate as doenças degenerativas quanto o meio ambiente no correto descarte de resíduos (OLIVEIRA et all., 2009).

A avalição do potencial antioxidante pode ser determinada por diversas técnicas tais como a quantificação de compostos fenólicos, DPPH, ABTS, FRAP e a auto oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico amplamente utilizadas para avaliar as atividades antioxidantes *in vitro* de substâncias biologicamente ativas as quais são ferramentas extremamente importantes que permite rápida seleção de substâncias com alto potencial terapêtico que podem ser aplicadas na prevenção de doenças crônico-degenerativa e na indústria alimentícia (ALMEIDA et al., 2006).

3.3.1 Compostos Fenólicos

As plantas apresentam vasta quantidade de compostos fenólicos em sua composição fitoquímica, estes podem ser encontrados de diferentes formas, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (NACZK et al., 2004).

Dentre as inúmeras substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos vêm chamando a atenção nos últimos anos, principalmente por possuírem ações contra a peroxidação lipídica (SOARES 2002).

O método se baseia no reagente de Folin Ciocalteau o qual em condições ácidas o ácido gálico reage com o complexo fosfomolibídico formado a partir do

reagente Folin ciocalteau esta reação apresentará uma mudança de coloração uma solução.

3.3.2 Atividade Antioxidante DPPH

A molécula de DPPH 1,1-difenil-2-picrilhidrazil é um radical nitrogênio orgânico, estável, com coloração violeta e sua absorção máxima fica na faixa de 515-520 nm (Figura 5). O DPPH é caracterizado como radical livre estável em solução, mas na presença de um composto doador de hidrogênio como o composto quercetina, este composto perderá um elétron e a molécula de DPPH captura este elétron e se estabiliza, provocando assim a mudança de coloração da reação que passa de violeta para amarelo (MOLYNEUX, 2004).

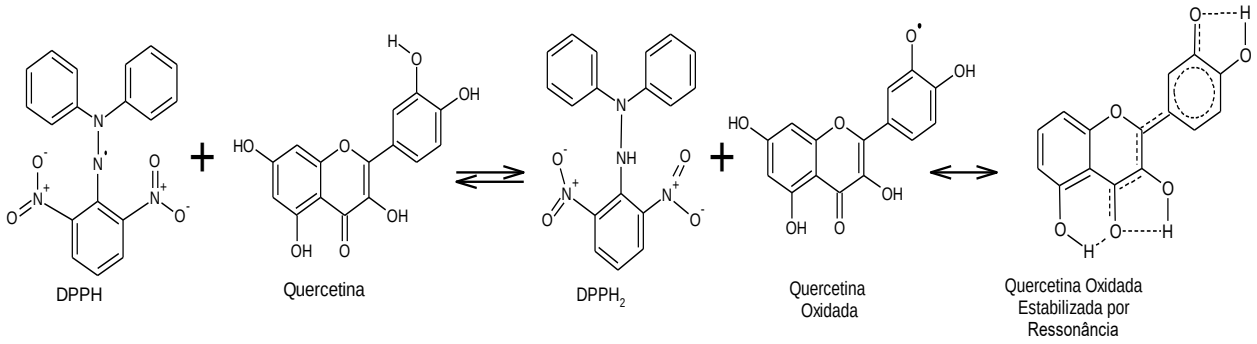


Figura 5 - Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico
Fonte: Adaptado TEIXEIRA (2013).

3.3.3 Atividade Antioxidante ABTS

O método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) é determinado pela análise espectrofotométrica aplicada para medição da atividade antioxidante total de substâncias puras, baseia-se na geração do ($ABTS^+$), por meio da reação do ABTS com o persulfato de potássio e na presença de um antioxidante, esta reação de redução do ABTS promoverá uma perda da coloração da reação, conforme (Figura 6) (RE et al., 1999).

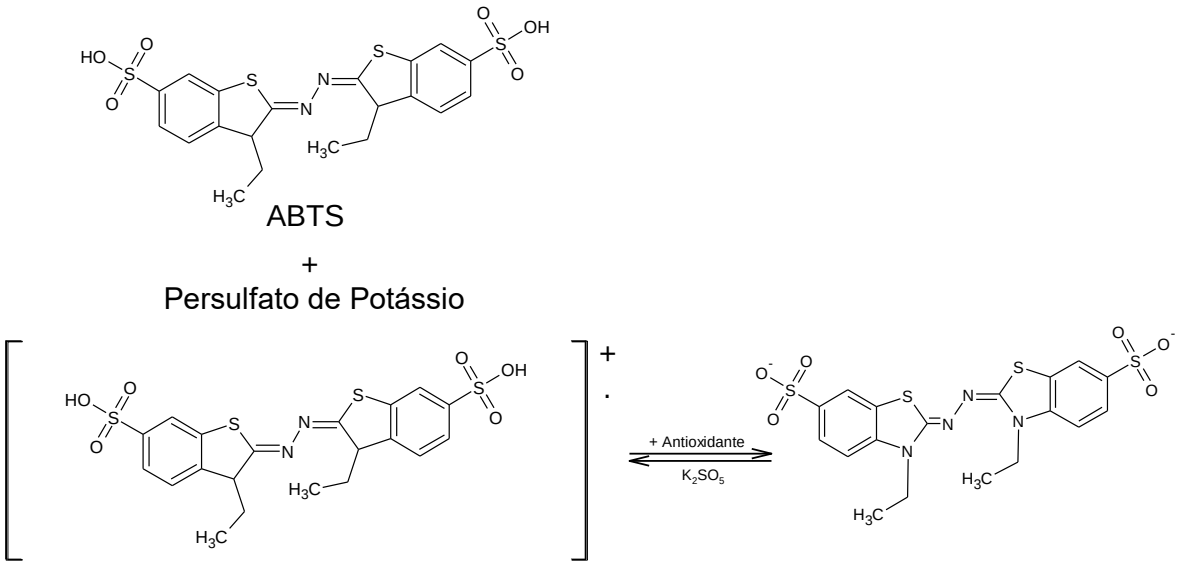


Figura 6 - Reação de oxirredução do radical ABTS
Fonte: Adaptado RUFINO (2006).

3.3.4 Atividade Antioxidante FRAP

O método FRAP (capacidade antioxidante de redução do ferro) é o mais utilizado para as análises antioxidantes por ser tratar da redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}. A reação ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas com a formação de um complexo corado, no qual seria a redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{III}-TPZ) ao complexo ferroso (Fe^{II}-TPZ) em presença de um antioxidante, conforme (Figura 7) (RUFINO et al., 2006).

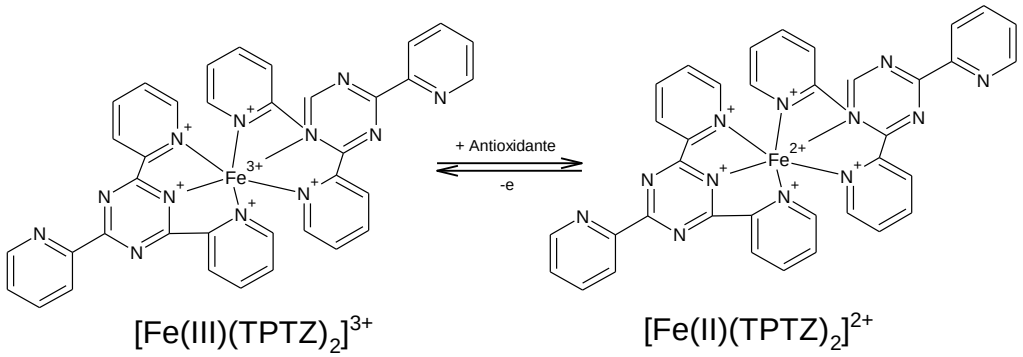


Figura 7 - Redução do complexo $Fe3^+$ a Fe^{2+}
Fonte: Adaptado RUFINO (2006).

3.3.5 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β-caroteno e ácido linoleico

Amplamente utilizado em terapias o β-caroteno (Figura 8) é o mais abundante dos carotenoides, é pouco solúvel em água e mais solúvel em solventes pouco polares (ALVES et al., 2010).

O método baseia-se na oxidação do β-caroteno/ácido linoleico e avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. A descoloração é detectada espectrofotometricamente da alteração do β-caroteno devido aos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (ALMEIDA et al., 2006).

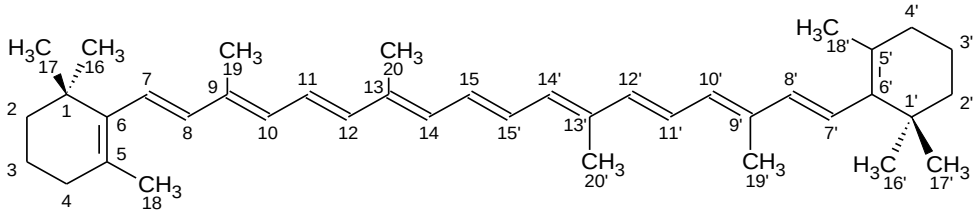


Figura 8 - Estrutura do β-caroteno

4. DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE DIABETES

Atualmente, a diabetes é considerada uma doença crônica com alta taxa de mortalidade, segundo dados recentes cerca de 170 milhões de pessoas em todo mundo sofrem de diabetes mellitus, e isto só vem a se agravar, pois especialistas dizem que até 2030 estima-se duplicar esta margem de pessoas que sofrem desta doença. A diabetes é caracterizada como hiperglicêmica crônica que danifica os vasos sanguíneos, promove a glicação de proteínas, altera o metabolismo energético e aumenta o estresse oxidativo nos tecidos (FANG et al., 2017; LEHRKE, et al., 2017).

A hiperglicemia é o aumento da glicose sérica a qual pode gerar estresse oxidativo e representa o principal fator das complicações observadas em diabéticos. Os níveis elevados de açúcares no sangue causam auto-oxidação da glicose, formando espécies reativas de oxigênio (EROs) tal como o ânion radical superóxido,

agentes pro-oxidantes como o peróxido de hidrogênio entre outros (BAYNES et al., 1999).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes do organismo humano e está relacionado ao aparecimento de muitas doenças crônicas. As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas pelo metabolismo celular, porém quando ocorre o acúmulo de EROS e há a ineficiência na capacidade de remoção do seu excesso no organismo humano há um desequilíbrio que resulta no agravamento de lesões celulares. Desse modo, os EROS desempenham papel fundamental no desenvolvimento de doenças crônicas (ZENG et al., 2017).

Os percussores de radicais livres mais comuns presentes no organismo humano são os ânions superóxido e o radical hidroxila (BARREIROS, 2006).

As plantas surgem como possíveis fontes terapêuticas para o combate destas espécies reativas, devido possuírem metabólitos secundários os quais podem possuir ações antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e anticancerígenos (TUPEC et al., 2017).

A aplicação das plantas como potenciais fontes terapêuticas nos organismos devem ser estudadas juntamente com a etiologia das doenças para que se possa avaliar os mecanismos de ação em diferentes sistemas biológicos com o intuito de esclarecer e predizer diagnósticos capazes de servirem como tratamento de alterações enzimáticas como alterações da catalase, superóxido dismutase e glutationa s-transferase (BAHAMONDE et al., 2014; JAQUES et al., 2013; LADDHA et al., 2013).

4.1 Catalase

A catalase é uma hemeproteína citoplasmática o qual catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Esta enzima pode ser encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Normalmente em modelos de extresse oxidativo doecorrentes de agressão térmica, os eterócitos exibem diminuição da atividade da enzima catalase (FERREIRA, 1997).

4.2 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase pertence a uma família de enzimas de diferentes grupos prostéticos em sua composição. Esta enzima possui papel fundamental como um antioxidante pois catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. (FERREIRA, 1997).

4.3 Glutationa s-transferase

A glutationa S-transferase, compreende uma família de enzimas o qual catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa a compostos que apresentem um carbono, nitrogênio ou um átomo de enxofre. Geralmente são encontradas no meio biológico como homo ou heterodímeros (HUBER, 2008).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas referentes ao desenvolvimento desse estudo estão resumidas no fluxograma abaixo Figura 9.

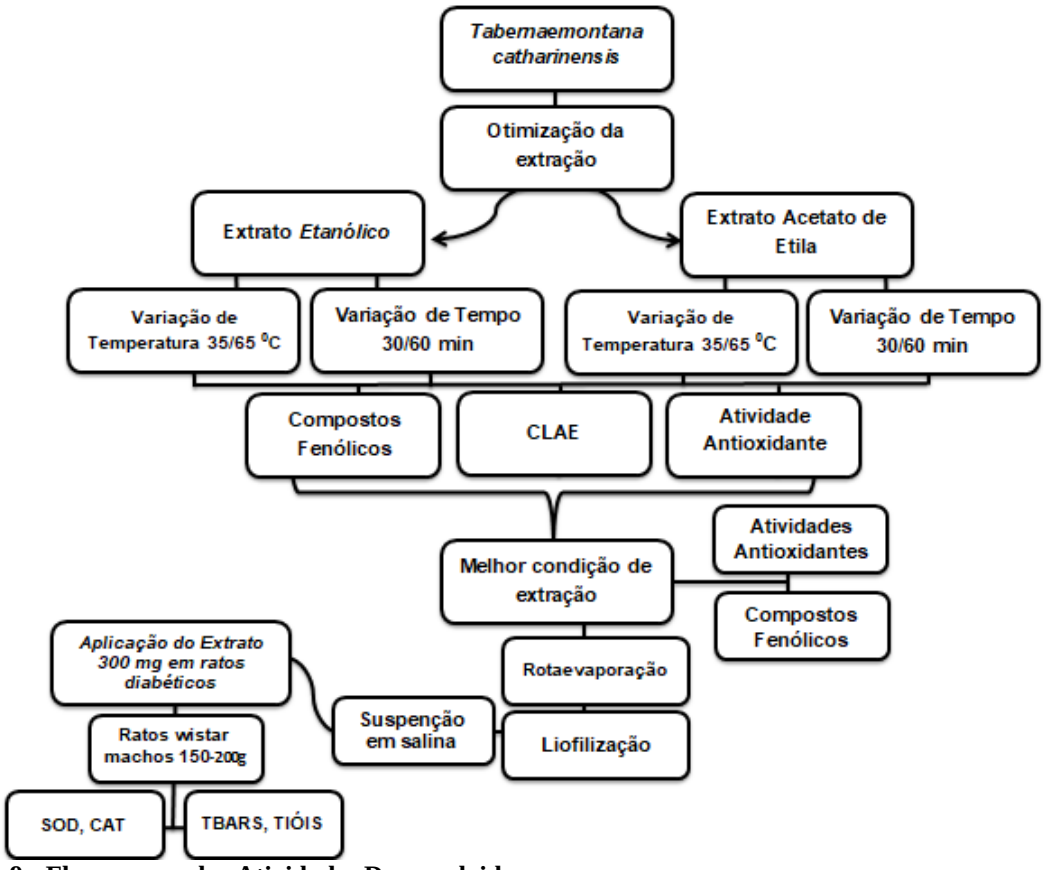


Figura 9 - Fluxograma das Atividades Desenvolvidas.

5.1 Obtenção das folhas de *Tabernaemontana catharinensis*.

Os materiais vegetais foram coletados na área indígena da cidade de Tenente Portela (latitude 27º22'16" sul e longitude 53º45'30") oeste do estado do Rio Grande do Sul.

A escolha do material vegetal se deu pelo fato de que os indígenas da região utilizarem as folhas, cascas e raízes difundidas em etanol contra doenças de pele e contra picadas de cobras, sem que exista nenhuma comprovação cientifica dos possíveis efeitos da planta, tais atividade apresentadas pela espécie nos intrigou e

nos motivou para se trabalhar com as folhas da *T. catharinensi*s, afim de se buscar o porquê deste efeito apresentado pela planta, visando analisar o extrato como possível terapia auxiliar contra a patologia Diabetes.

5.2 Processamento das folhas de Tabernaemontana catharinensis.

Após a coleta, o material vegetal foi seco em estufa (Nova Ética) a 35 ^{0}C por 48 horas e triturados em moinho de facas (Tecnal) para a realização da extração via delineamento fatorial.

5.3 Extração de compostos bioativos da *T. Catharinensis* e delineamento fatorial

Utilizou-se um delineamento fatorial 2^3, totalizando-se 8 corridas em triplicadas (Tabela 1), para verificar os efeitos das variáveis independentes: solvente (etanol e acetato de etila), tempo de extração (30 e 60 min) e temperatura (35 e 65 ºC) sobre o teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição fenólicoa por cromatografia líquida de alta eficiência (definidos como variáveis independentes). As variáveis independentes serão X1 o solvente, a variável X2 a temperatura de extração (°C) e a variável X3 é o tempo de extração (min) (Tabela 2) e as variáveis dependentes utilizadas foram: o teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante através do método do sequestro do radical DPPH e a caracterização dos compostos fenólicos presentes nos extratos das folhas de *T. catharinensis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tabela 1 - Planejamento Fatorial

	Variáveis Codificadas				Variáveis Reais		
	Ensaios	**X1**	**X2**	**X3**	**Solvente**	**Tempo (min)**	**Temperatura (^oC)**
Tabernaemontana Catharinensis	A1	-1	-1	-1	Ac.etila	30	35
	A2	+1	-1	-1	Etanol	30	35
	A3	-1	+1	-1	Ac. etila	60	35
	A4	+1	+1	-1	Etanol	60	35
	A5	-1	-1	+1	Ac. etila	30	65
	A6	+1	-1	+1	Etanol	30	65
	A7	-1	+1	+1	Ac. etila	60	65
	A8	+1	+1	+1	Etanol	60	65

Tabela 2 - Condições e Variáveis utilizadas no delineamento fatorial

	Variável	**(-1)**	**(+1)**
X1	Solvente	Acetato de etila	Etanol
X2	Tempo	30 min	60 min
X3	Temperatura	35 °C	65° C

A extração dos compostos fenólicos realizou-se conforme PRADO (2009). Os solventes etanol e acetato de etila foram utilizados para extração de compostos naturais de folhas de *T. catharinensis*. A massa de 3 g do triturado de folhas foram transferidas para Erlenmeyers e adicionados 30 mL dos solventes separadamente e submetidos à agitação em *Shaker* (sempre descrever marca, modelo e país de fabricação do equipamento SL 222) à 120 rpm por minuto conforme delineamento experimental demonstrado na Tabela 1. Em seguida, os extratos foram transferidos para tubo *Falcon* e centrifugados a 500 rpm (*Hermle* Z 200 A) durante 15 minutos, na sequencia os sobrenadantes foram filtrados e armazenados em frascos hermeticamente fechados, sob abrigo de luz e acondicionados em freezer a - 5 ºC para posteriores análises. Cada extração foi realizada em triplicata, totalizando 24 ensaios.

A melhor condição de extração foi determinada pela quantificação de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante pelo método DPPH expresso em mg de Trolox/g de amostra e pela caracterização dos compostos fenólicos realizados pela cromatografia liquida de ala eficiência.

5.4 Determinações de compostos fenólicos totais método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau, descrito por Singleton (1999), no qual uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio sendo adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocateau (10%). Após 5 minutos de repouso da mistura, adicionam-se 2,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 (4%). As soluções foram conservadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente e após 2 horas foram realizadas as leituras das absorbâncias a 740 nm. Utilizando como padrão de referência o ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalente em ácido gálico.g^{-1} de amostra (mg GAE.g^{-1}) e calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variam de 1,25 a 62,5 µg.mL^{-1} $y = 0.0211x – 0.0168$, $R^2 = 0,998$).

5.5 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO*

5.5.1 Atividade de sequestro do radical DPPH•

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). Para avaliação da atividade antioxidante os extratos foram reagidos com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH• possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio transferido de um composto antioxidante. A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol anidro e 0,3 mL da solução alcoólica do radical DPPH 0,3 mmol L^{-1}. Os resultados foram expressos em µmol de trolox/g de amostra através da curva padrão utilizando o antioxidante trolox como padrão e com o tempo de reação de 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.5.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β-caroteno e ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante foram determinadas pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoleico, de acordo com Ahn et al. (2004). Uma solução de β-caroteno foi preparada com 10 mg de β-caroteno e dissolvidos em 100 mL de clorofórmio, 3 mL da solução foi homogeneizada com 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40 e em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão β-caroteno/ácido linoleico foram misturadas com 300 µL dos extratos das folhas de *T. catharinensis em uma concentração de 0,02 g/mL*. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas com incubação a 50 ºC, para a reação de oxidação. A amostra controle contém 300 µL de etanol a 80%. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante é expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, usando a (Equação 1):

$$\boldsymbol{AA}(\%) = \frac{\boldsymbol{DRc - DRs}}{\boldsymbol{DRc\ x\ 100}}$$

Equação 1 - Porcentagem de inibição relativa em relação ao controle.

Onde:

AA representa a atividade antioxidante

DR_C a taxa de degradação da amostra controle (ln(a/b)/120);

DR_S a taxa de degradação da amostra contento a substância teste (ln(a/b)/120);

a: absorbância inicial no tempo 0 e

b: a absorbância depois de 100 min.

5.5.3 Atividade antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$

A capacidade de sequestrar o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS•+) segue o método descrito por Re *et al.*, 1999. O radical ABTS•+ gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS• (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140mM). Esta solução foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16 horas e após esse período, diluiu-se a solução em etanol até obter absorbância no comprimento de onda de 700 a 734 nm. Foram adicionadas nas amostras a solução do ABTS•+ e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 minutos de reação. Como referência utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um antioxidante sintético equivalente à vitamina E, nas concentrações de 0,0015 a 0,045 µmol para a curva padrão y = 10,666x - 0,5757, R^2 = 0,999. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol $TEAC.g^{-1}$ de amostra (TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

5.5.4 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro - FRAP

A determinação da atividade antioxidante mediante a redução do ferro (FRAP) segue a metodologia descrita por Kukić et al., (2008). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl), e 2,5mL de $FeCl_3$ (20 mM), em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL das amostras foram adicionadas a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foram desenvolvida com sulfato ferroso (200 a 2000 µM), e os resultados expressos em µmol $Fe^{2+}.g^{-1}$ de amostra.

6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE-DAD

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Varian, 920-LC, Walnut Creek, EUA) acoplada a um detector de matriz de fotodiodo (PDA).

As análises foram realizadas em coluna C18 FR (250 x 4,6 mm, 5 µm) utilizando fluxo de 1 mL min^{-1}, temperatura da coluna de 30°C. Composição da fase móvel: (A) H_2O:H_3PO_4 (99,8:0,2 v v-1); (B) CH_3OH (100%) com gradiente iniciando com 30% de B, em 15 min 64% de B, 11 min 75% de B, 2 min 95% de B, 1 min 95% de B, 3 min 30% de B e finalmente 10 min em 30% de B, totalizando 42 min de análise. A quantificação foi realizada por padronização externa em uma faixa de concentração que variou de 0,5 µg mL^{-1} a 60 µg mL^{-1} . As curvas de calibração e regressão linear baseada nas áreas de pico foram utilizadas para identificar e quantificar os picos correspondentes aos compostos fenólicos. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por comparação do tempo de retenção do sinal analítico com padrões autênticos nos comprimentos de onda de 280 nm e 320 nm. Os padrões utilizados neste estudo foram Ácido cafeico (ACA), ácido ferúlico (AFE), ácido p-cumárico (APC), ácido trans cinâmico (ACT), rutina (RUT), quercetina (QUE), pinocembrina (PIN), crisina (CRI), canferol (CAN), mangiferina (MAN) e galangina (GAL) de acordo com o método de Oldoni et al., 2015.

Os teores de compostos fenólicos foram expressos para cada composto em µg/g de amostra. A determinação dos compostos fenólicos por CLAE foi realizada em triplicata.

7. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

7.1 Animais

No experimento foram utilizados ratos Wistar machos adultos (200 - 250g), obtidos do Biotério da Universidade Comunitária da Região de Chapecó - Unochapecó (Chapecó, SC, Brasil). Os animais foram mantidos no Biotério da

Faculdade de Pato Branco - FADEP em um ambiente com temperatura controlada (23°C ± 1) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. As dietas, tanto sólida quanto líquida, foram fornecidas *ad libitum.*

7.2 Aspectos Éticos

Os ensaios foram desenvolvidos no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (PPGTP) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Pato Branco e em parceria com a Faculdade de Pato Branco (FADEP), na cidade de Pato Branco-PR.

Todos os experimentos e coletas descritos foram realizados respeitando os princípios éticos de experimentação e somente foi executado o projeto após a aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais da FADEP sob o número: 001/17.

7.3 A Indução da diabetes

A indução do modelo experimental de diabetes em ratos wistar foi realizada via injeção intraperitonial de 55 mg/kg de estreptozotocina (STZ) diluída em tampão de citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5). Os ratos controle receberam injeção intraperitoneal de volume equivalente ao seu peso somente com tampão citrato de sódio. Os ratos do grupo com estreptozotocina receberamo 5% de glicose em substituição a água por 24 h após a indução da diabetes, com o objetivo de diminuir a mortalidade provocada pelo choque hipoglicêmico.

7.4 O tratamento

O tratamento dos animais no modelo experimental de diabetes realizou-se utilizando a melhor condição de extração das folhas de T. *catarinenses* (extrato A8), no qual o extrato foi rotaevaporado em evaporador rotativo modelo TE-211 Tecnal e liofilizado em liofilizador modelo L108 Liotop, para então administração do extrato via oral 300mg/kg diluído em solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%). A administração via oral do extrato foi utilizado agulha de gavagem a qual assegura dosagem adequada sem causar danos e prejuízos para o animal e ao experimento.

7.5 Os grupos do modelo experimental

Os animais do modelo experimental de diabetes foram divididos em quatro grupos (n=6): Controle salina, Controle Cobrina 300 mg/kg, Diabetes, Diabetes + Cobrina 300 mg/kg totalizando 24 ratos machos Wistar. O período de tratamento foi de 30 dias utilizando o extrato da melhor condição extração (extrato A8) das folhas de *T. catharinensis.*

8. ANÁLISES ANTIOXIDANTES *EX VIVO*

8.1 Ensaio Da Enzima Superóxido Dismutase

A técnica de dosagem da enzima superóxido dismutase é baseada na inibição do radical superóxido com a adrenalina, ao ocorrer à oxidação da adrenalina um novo produto é formado, conhecido como adrenocromo e então detectado pelo espectrofotômetro modelo UV-1800 Shimadzu, em um comprimento de onda de 480nm. Para determinação da atividade da SOD os tecidos foram homogeneizados em tampão K_2HPO_4 0,05 M, pH 7, foram centrifugado em centrífuga (ThermoFisher

Scientific) a 8000 por 15 min e alíquotas apropriadas do sobrenadante foram utilizados para ensaio enzimático, pelo método de Misra & Fridovich (1972). A atividade enzimática foram expressas em unidades de SOD/mg de proteína. A dosagem da proteína foi determinada de acordo com o método de Brandford (1951), utilizando como padrão uma solução de albumina bovina.

8.2 Ensaio Da Enzima Catalase

A determinação da atividade de CAT segue o método modificado de NELSON & KIESOW (1972). O ensaio envolveu a mudança de absorbância a 240nm devido à decomposição CAT na presença de peróxido de hidrogênio. Uma alíquota (20µL) do tecido (diluído 1:10 com NaCl 0,9%) foi homogeneizado em 1,910µL de tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,0. A determinação espectrofotométrica foi iniciada pela adição de 70µL de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) 0,3mol L^{-1}. A alteração na absorbância 240nm foi medida durante 2min em modo cinético utilizando um espectrofotômetro modelo UV-1800 Shimadzu. A atividade de CAT foi calculada e os resultados foram expressos como nmol de CAT por min por mg de proteína. As proteínas dos ensaios enzimáticos foram mensuradas pelo método de BRADFORD (1951), utilizando a albumina como padrão.

8.3 Determinação Da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica dos tecidos segue o método de Ohkawa. Em tubos de ensaios, foram adicionados 100 µL de água, 200 µL de SDS 8,1% (m/v), 500 µL de ácido acético 1,5 M, 200 µL de amostra do tecido e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (m/v). Os tubos de ensaio foram agitados vigorosamente e em seguida levados a banho-maria a 95 ºC por 2 horas. Após esse período, foram centrifugados em centrífuga modelo Thermo Fisher Scientific a 2000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi separado e a absorbância medida em espectrofotômetro modelo UV-1800 Shimadzu a 532 nm. Os níveis plasmáticos de MDA são expressos como nmol MDA por g de tecido.

A determinação da peroxidação lipídica do cérebro total foi determinada conforme descrito por Jentzsch et al. (1996), em que se utiliza ácido ortofosfórico e ácido tiobarbitúrico (TBA) como reagentes. As amostras foram incubadas em 95ºC durante 45 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro visível modelo UV-1800 Shimadzu, em 532 nm. Os resultados foram expressos por nmol MDA por grama de tecido.

8.4 Determinação Da Glutationa S-Transferase

A atividade da enzima Glutationa S-Transferase (GST) segue a metodologia de Habig et al., (1974) usando CDNB como substrato (preparado em H_2O ultrapura). O ensaio foi conduzido em triplicata, a 25 ^{0}C, com tampão fosfato de potássio 0,1M e pH 7,4, na presença de 1mM de glutationa reduzida, 1mM de CDNB, 100µL da enzima. A mudança direta da absorbância, quando o substrato está conjugado com a glutationa, foi monitorada em modo cinético a 340nm por 2 minutos, anotando os valores das absorbâncias a cada 30 segundo, utilizando um espectrofotômetro modelo UV-1800 Shimadzu. A dosagem da proteína foi determinada de acordo com o método de Brandford (1951), utilizando como padrão uma solução de albumina.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Otimização via compostos fenólicos totais e atividade antioxidante DPPH

9.1.2 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante DPPH

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos de folhas de *T. catharinensis* variou de 0,561 a 2,027 mg EAGg^{-1} enquanto que a atividade antioxidante variou de 18,584 a 31,959 µmol de Trolox.g^{-1} (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados obtidos referente ao delineamento fatorial para CFT (mg EAG g^{-1}) e AA (µmol Trolox g^{-1}) em extratos de folhas de *T. catharinensis*.

Ensaios	Variáveis			*Tabernaemontana catharinensis*	
	X1	X2 (min)	X3 (^{o}C)	TCF (mg de EAG/g)	AA (µmol de Trolox/g)
A1	(-1) Acetato de Etila	(-1) 30	(-1) 35	0,561 ± 0,075	18,584 ± 0,797
A2	(+1) Etanol	(-1) 30	(-1) 35	0,981 ± 0,058	26,833 ± 0,637
A3	(-1) Acetato de Etila	(+1) 60	(-1) 35	0,670 ± 0,026	21,353 ± 0,611
A4	(+1) Etanol	(+1) 60	(-1) 35	1,047 ± 0,036	24,800 ± 2,159
A5	(-1) Acetato de Etila	(-1) 30	(+1) 65	0,759 ± 0,043	19,727 ± 1,200
A6	(+1) Etanol	(-1) 30	(+1) 65	1,294 ± 0,129	27,068 ± 1,150
A7	(-1) Acetato de Etila	(+1) 60	(+1) 65	1,070 ± 0,066	20,705 ± 0,889
A8	(+1) Etanol	(+1) 60	(+1) 65	2,027 ± 0,312	31,959 ± 2,038

A análise de variância (ANOVA) de uma via demonstra (Tabela 4) que a as três variáveis testadas (solvente, tempo e temperatura) apresentaram influência significativa na extração de compostos fenólicos, assim como a interação solvente e tempo de extração, e tempo e temperatura.

Tabela 4 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes CFT em extratos das folhas de T. catharinensis.

Fatores	Compostos fenólicos					
	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F-calculado	F-tabelado	p-valor
Solvente (X1)	**1,961**	**1**	**1,961**	**97,144**	**4,45**	**0,000**
Tempo (X2)	**1,341**	**1**	**1,341**	**66,417**	**4,45**	**0,000**
Temperatura (X3)	**0,556**	**1**	**0,556**	**27,538**	**4,45**	**0,000**
X1; X2	**0,181**	**1**	**0,181**	**9,009**	**4,45**	**0,008**
X1; X3	0,054	1	0,054	2,675	-	0,120
X2; X3	**0,282**	**1**	**0,282**	**13,989**	**4,45**	**0,001**
Resíduo	0,343	17	0,020	-	-	-
Total	4,720	23	-	-	-	-

*G.L-Graus de liberdade.

A análise de variância (ANOVA) de uma via revelou que (Tabela 5) para a extração de compostos bioativos das folhas de *T. catharinensis* dois fatores analisados (solvente e tempo), assim como as interações entre solvente e tempo de extração, e tempo e temperatura foram significativos e influenciaram a extração de compostos com potencial de sequestrar o radical DPPH.

Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes AA em extratos das folhas de T. catharinensis.

Fatores	Atividade Antioxidante DPPH					
	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F-calculado	F-tabelado	p-valor
Solvente (X1)	**287,097**	1	**287,097**	**62,502**	**4,45**	**0,000**
Tempo (X2)	**41,438**	1	**41,438**	**9,021**	**4,45**	**0,007**
Temperatura (X3)	5,948	1	5,948	1,294	-	0,270
X1; X2	**33,995**	1	**33,995**	**7,401**	**4,45**	**0,014**
X1; X3	4,621	1	4,621	1,006	-	0,329
X2; X3	**22,550**	1	**22,550**	**4,909**	**4,45**	**0,040**
Resíduo	78,087	17	4,593	-	-	-
Total	473,739	23	-	-	-	-

*G.L-Graus de liberdade.

O nível de significância pode ser observado para cada variável do modelo representado pelo valor F em que o valor de F calculado maior que o F tabelado denota diferença significativa para determinado fator. As Tabelas 4 e 5 demonstram os fatores considerados significativos em que é preciso salientar que o F calculado apresenta valores muito maiores do que o F tabelado: 4,45. A maior diferença encontrada para a variável dependente composto fenólico foi no fator solvente, que atingiu 21 vezes maior que o F tabelado, e a variável dependente atividade antioxidante o maior valor do F-calculado foi o fator solvente que atingiu valor de 14 vezes maior que o F-tabelado.

Outra forma de se constatar os resultados descritos na Tabela 4 e 5 é através dos gráficos de Pareto, mostrados pela Figura 10. O gráfico de Pareto mostra os possíveis efeitos dos fatores: solvente, tempo e temperatura de extração sobre as respostas analisadas.

Os efeitos de cada variável independente foram calculados pela análise de variância e exemplificados pelo gráfico de Pareto, conforme pode ser observado pela Figura 10 a,b. Os compostos fenólicos apresentaram efeito positivo e significativo nas variáveis solvente, tempo, temperatura; e na interação tempo e temperatura, solvente e tempo Figura 10a.

Já os efeitos significativos em relação à atividade antioxidante tiveram efeito positivo e significativo nas variáveis, solvente, tempo; e na interação solvente e temperatura, tempo e temperatura. Porém, a variável temperatura apresentou efeito negativo, o qual demostra que a variável temperatura não influenciou na extração da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, conforme pode ser verificado na Figura 10b.

Figura 10 - Gráfico de Pareto para *T. catharinensis* e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (1a) e atividade antioxidante (1b).

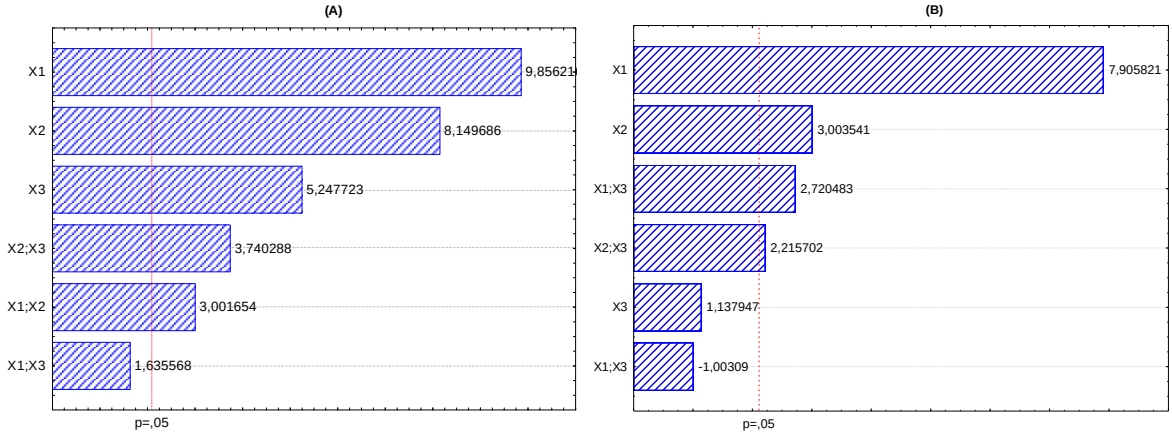


Figura 11: X1: Solvente; X2: tempo; X3: temperatura. $X_1;X_2;X_3$: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Os resultados obtidos também foram analisados por regressão linear múltipla a qual gera modelos ajustados contendo somente os efeitos significativos para as variáveis dependentes fenólicos totais e atividade antioxidante para as folhas de *T. catharinensis* Tabela 6, Equações 2 e 3.

Tabela 6 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores; solvente, tempo e temperatura.

Equações	Modelo Gerado	Coeficiente de Correlação (R^2)
Equação 2	TCCF = 1,051067 + 0,285892x1 + 0,236392x2 + 0,152217x3 + 0,087067x1x2 + 0,108492x2x3	0,927
Equação 3	TCDPPH = 23,55083 + 3,45867x1 + 1,31400x2 + 1,19017x1x2 + 0,96933x2x3	0,835

TCCF: *Tabernaemontana catharinensis* / Reposta: Compostos fenólicos;
TCDPPH: *T. catharinensis* / Reposta: DPPH. X1 solvente; X2 tempo; X3 temperatura.

O modelo de regressão linear múltipla gera uma superfície de resposta em que se observa no eixo x as variáveis dependentes para os compostos fenólicos e atividade antioxidante em função das variáveis independentes, solvente, tempo e temperatura de extração. Os altos coeficientes de correlação indicam ajustes de 83% a 92% do modelo aos dados experimentais para atividade antioxidante e compostos fenólicos totais respectivamente, e através dos modelos gera-se uma superfície de resposta para cada variável dependente, conforme as Figuras 11A, 11B, 11C e 12A, 12B.

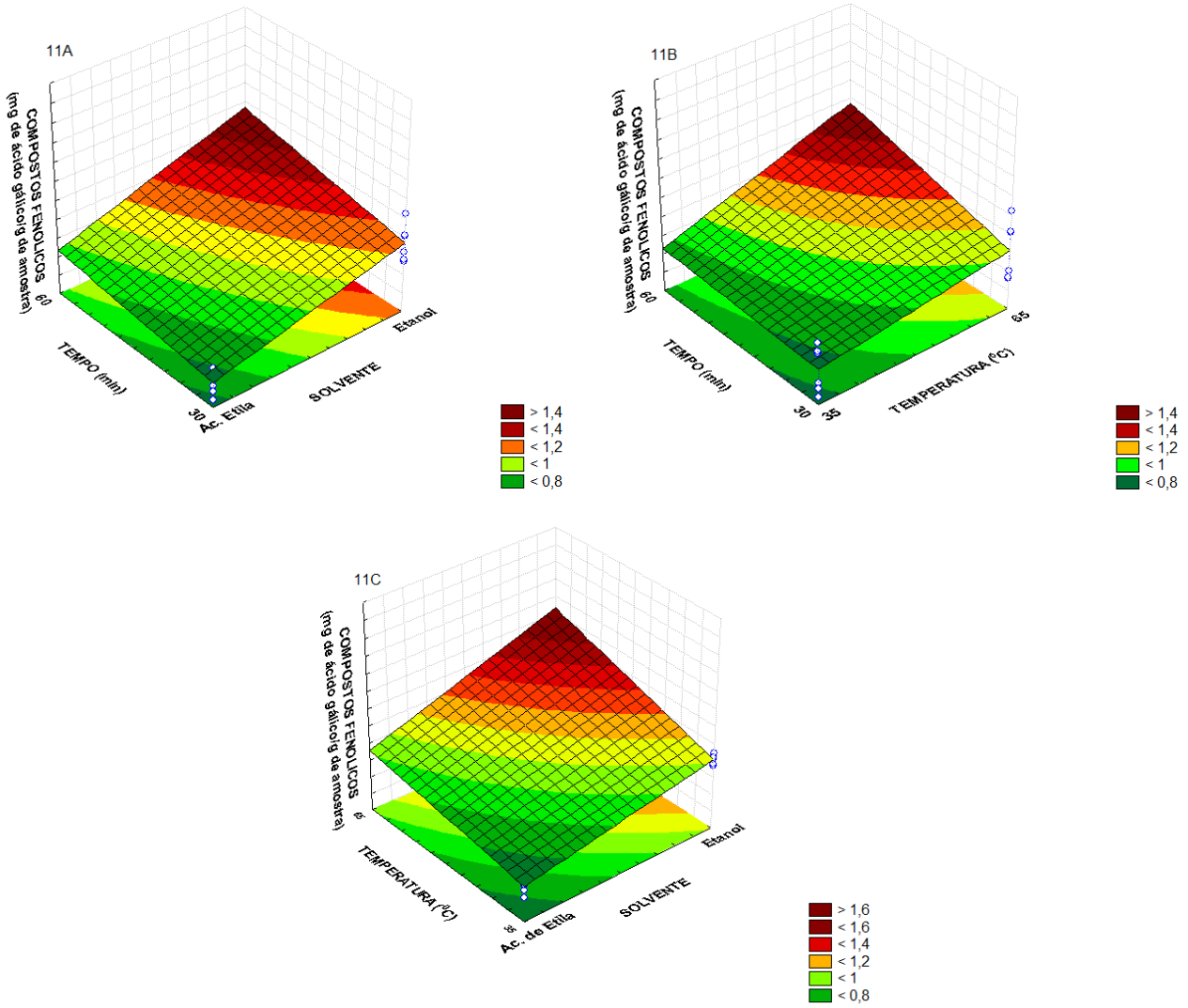


Figura 11: Superfícies de resposta (A) solvente x tempo; (B) temperatura x tempo; (C) Temperatura x solvente

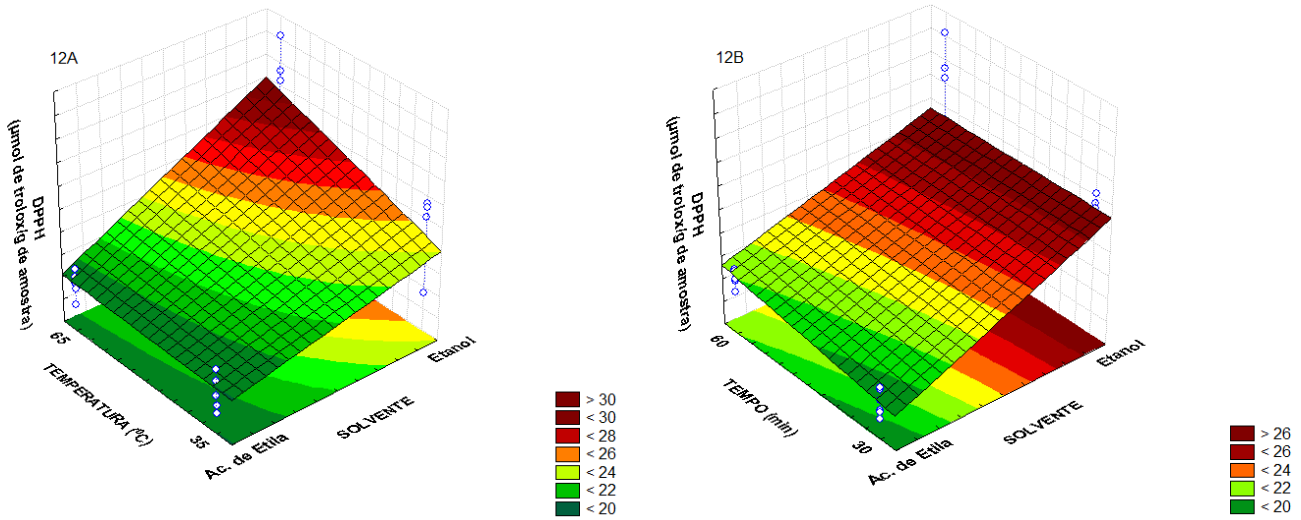


Figura12A,B - Gráficos de Superfície referente à resposta Atividade antioxidante DPPH.

Nas Figuras 11 A, 11 B e 11 C é possível perceber que o solvente etanol, temperatura de 65^0 C e um tempo de 60 minutos, foram as variáveis mais eficientes para a extração dos compostos fenólicos. Estes resultados encontrados no nosso estudo condizem com o que relata SIMÕES (2007) que ao estudar os compostos fenólicos afirma que a solubilidade dos compostos fenólicos é conduzida pela polaridade do solvente, os quais solventes mais polares como no caso o etanol conseguem solubilizar melhor os compostos fenólicos. Já XU (2007) afirma em seu estudo que o aumento da temperatura, torna as paredes celulares dos compostos fenólicos mais permeáveis aumentando assim a solubilidade e diminuindo a viscosidade do solvente. Esta influência das variáveis estudadas também pode ser verificada quando analisada os resultados para a atividade antioxidante DPPH, o qual um aumento de tempo e utilizando etanol como solvente extrator houve uma melhora para a resposta da atividade antioxidante DPPH, conforme pode ser verificado nas figuras 12 A e 12 B.

9.2 Otimização Via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

9.2.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os resultados do teor de extração de compostos fenólicos presentes no extrato das folhas de *T. catharinensis* após os tratamentos A1 a A8 (Tabela 7) demonstram perfil cromatográfico com presença dos compostos fenólicos quercetina, rutina, ácido ferúlico e pinocembrina. Os teores variam em função do composto extraído e de acordo com as características de cada ensaio. Os teores de pinocembrina obtidos nos ensaios A1 (acetato de etila, 30 min e 35 ^{0}C), A3 (Acetato de Etila, 60 min, 35 ^{0}C), A5 (Acetato de Etila, 30 min, 65 ^{0}C) e A7 (Acetato de Etila, 60 min, 65 ^{0}C) não demonstraram variação significativa estatisticamente.Tukey ($p<0.05$) (Tabela 7).

No ensaio A6 (Etanol, 30 min, 65 ^{0}C) ocorreu aumento significativo no teor de quercetina quando comparado com os ensaios A2 (Etanol, 30 min, 35 ^{0}C), A4 (Etanol, 60 min, 35 ^{0}C) e A8 (Etanol, 60 min, 65 ^{0}C) (Tabela 7). O teor de rutina no ensaio A6 (Etanol, 30 min, 65 ^{0}C) houve aumento significativo da extração quando comparado aos ensaios A2 (Ethanol, 30 min, 35 °C), A4 (Ethanol, 60 min, 35 °C) e A8 (Ethanol, 60 min, 65 °C) (Tabela 7). Os ensaios A2 (Etanol, 30 min, 35^{0}C) e A4 (Etanol, 60 min, 35^{0}C) houve aumento de extração no teor de rutina quando comparados ao ensaio A8 (Etanol, 60 min, 65^{0}C) (Tabela 7).

Com relação ao ácido fenólico ferúlico houve aumento significativo no ensaio A8 (Etanol, 60 min, 65^{0}C) quando comparado com o ensaio A2 (Etanol, 30 min, 35^{0}C) (Tabela 7). No teor de extração do ácido cumárico houve aumento significativamente no ensaio A8 (Etanol, 60 min, 65^{0}C) quando comparado com aos ensaios A2 (Etanol, 30 min, 35^{0}C) e A4 (Etanol, 60 min, 35^{0}C) (Tabela 7).

Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos expressos em (µg/g) por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos das folhas de Tabernaemontana catharinensis.

				Compostos Fenólicos (µg/g)					
Amostras	**Solventes (S)**	**Tempo (min)**	**Temperatura (^{0}C)**	**Amostras**	**Quercetina**	**Rutina**	**Ác. Ferulico**	**Ác. Cumarico**	**Pinocembrina**
A1	Acetato Etila (-1)	30 (-1)	35 (-1)	A1	>LD	.>LD	>LD	>LD	0,154^a ± 0,038
A2	Etanol (+1)	30 (-1)	35 (-1)	A2	0,166^b ± 0,015	0,354^c ± 0,038	0,014^b ± 0,000	0,015^b ± 0,001	0,016^b ± 0,002
A3	Acetato Etila (-1)	60 (+1)	35 (-1)	A3	>LD	>LD	>LD	>LD	0,148^a ± 0,003
A4	Etanol (+1)	60 (+1)	35 (-1)	A4	0,186^b ± 0,007	0,382^c ± 0,015	0,020^{bc} ± 0,002	0,020^{bb} ± 0,001	0,016^b ± 0,003
A5	Acetato Etila (-1)	30 (-1)	65 (+1)	A5	>LD	>LD	>LD	>LD	0,157^a ± 0,009
A6	Etanol (+1)	30 (-1)	65 (+1)	A6	0,257^a ± 0,031	0,512^a ± 0,056	0,023^{bc} ± 0,007	0,023^{ab} ± 0,003	0,015^b ± 0,001
A7	Acetato Etila (-1)	60 (+1)	65 (+1)	A7	>LD	>LD	>LD	>LD	0,141^a ± 0,001
A8	Etanol (+1)	60 (+1)	65 (+1)	A8	0,140^b ± 0,001	0,189^b ± 0,001	0,026^{ac} ± 0,005	0,050^{ac} ± 0,000	0,015^b ± 0,000

> LD: Menor que o limite de detecção. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em médias. Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha para T. catharinensis iniciais são significativamente diferentes entre os compostos fenólicos (p <0,05). Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre os extratos de tratamento (A1 à A8) (P <0,05). Fonte: Autor (2018).

O comportamento na variação dos teores da extração dos compostos fenólicos está diretamente relacionado às variáveis independentes o solvente, o tempo e a temperatura. De acordo com Souza-Sartori et al. (2012) a utilização de 40% de etanol e temperatura de 70 ^{0}C é o ensaio que melhor extrai os flavonoides nas partes aéreas da cana de açúcar. Vedana et al. (2008) também demonstra que a extração hidro alcoólica a quente associada a trituração favorece a extração dos compostos fenólicos presentes na uva devido aumentar a habilidade de extração dos compostos fenólicos. A utilização de temperatura torna as paredes celulares mais permeáveis, aumentando a solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos que possibilita diminuição da viscosidade do solvente facilitando a extração (Xu et al., 2007).

Segundo Simões et al. (2007) a solubilidade dos compostos fenólicos é conduzida pela polaridade do solvente, no estudo o solvente etanol possui característica de polaridade semelhante aos compostos fenólicos presentes nas plantas os quais encontram-se normalmente no estado livre na forma de ésteres ou heterosídeos altamente solúveis em solventes polares. Os resultados de teor de extração do estudo estão de acordo com a literatura em que a utilização de solvente polar e a temperatura maior promovem a melhor extração dos compostos fenólicos.

A análise de variância (ANOVA) revelou ajuste adequado dos dados do modelo experimental utilizado neste trabalho os quais foram submetidos ao tratamento térmico e analisados pelo Fatorial Design e metodologia de superfície de resposta (RSM) demonstrada na Tabela 8 e Figuras 1a-p. Os seis modelos gerados pelo algoritmo estabelecido pelo Factorial Design e pela RSM foram significativos estatisticamente ($p<0,05$). A relação F calculado e F tabelado variaram entre 757,56 a 2,66 (Tabela 8) indicando o correto ajuste dos dados ao modelo experimental. Os seis modelos gerados apresentaram coeficientes de correlação (R^2) com variação de 0,94 a 0,97 (Tabela 8) em que a variabilidade de dados é justificada pelos modelos gerados (Tabela 8).

Porém, alguns modelos apresentaram falta de ajuste e para contornar esta inadequação foi determinado o teste qui-quadrado para a pinocembrina, a quercetina, o ácido ferúlico e o ácido cumárico na resposta global ($p>0,94$; Tabela 8). A análise

indica que não há diferença significativa entre os valores observados e preditos para estas respostas e, somente para a rutina houve diferença estatística significativa entre os valores observados e preditos para o modelo (Tabela 8).

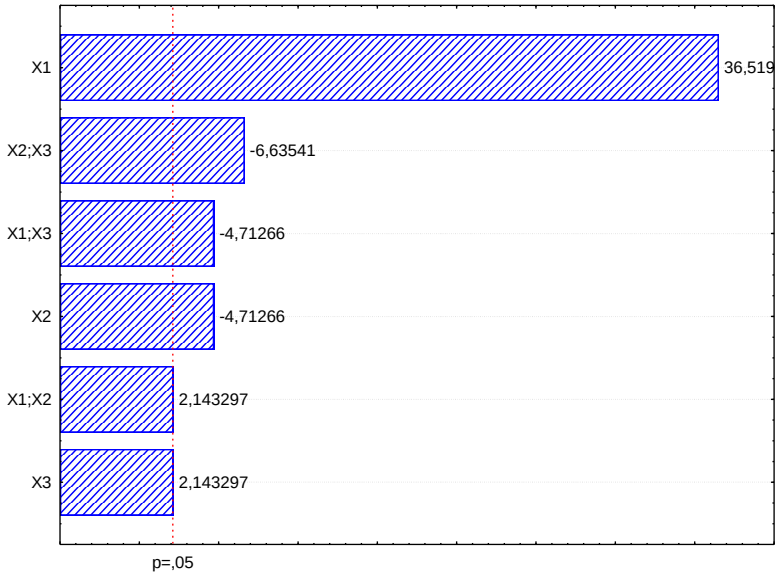
Tabela 8 - Análise da resposta de variância dos compostos fenólicos de *T. catharinensis* submetidos a tratamentos de acordo com (Factorial Design).

	Fonte de Variação	SQ	GL	$Q^2_{médio}$	$F_{calculado}$	R^2	$F_{Tabelado}$	p- valor	Teste Q^2
Quercetina	Modelo	2338,58	6	389,76	261,26	0,96	2,7	-	13,27
	Resíduo	25,36	17	1,49	-	-	-	-	-
	Total	2363,95	23	-	-	-	-	-	-
	Falta de ajuste	-	-	-	-	-	-	0,00	-
	Q^2	-	-	-	-	-	-	0,94	-
Rutina	Modelo	9354,60	5	1870,92	342,78	0,94	2,77	-	35,52
	Resíduo	98,24	18	5,45	-	-	-	-	-
	Total	9452,85	23	-	-	-	-	-	-
	Falta de ajuste	-	-	-	-	-	-	0,00	-
	Q^2	-	-	-	-	-	-	0,046	-
Ac. Ferulico	Modelo	29,98	3	9,99	149,12	0,95	3,1	-	0,88
	Resíduo	1,34	20	0,06	-	-	-	-	-
	Total	31,32	23	-	-	-	-	-	-
	Falta de ajuste	-	-	-	-	-	-	0,42	-
	Q^2	-	-	-	-	-	-	1,00	-
Ac. Cumárico	Modelo	67,00	7	9,57	492,79	0,97	2,66	-	2,16
	Resíduo	0,31	16	0,01	-	-	-	-	-
	Total	67,31	23	-	-	-	-	-	-
	Falta de ajuste	-	-	-	-	-	-	0,00	-
	Q^2	-	-	-	-	-	-	1,00	-
Pinocembrina	Modelo	1096,57	1	1096,57	757,56	0,97	4,3	-	2,38
	Resíduo	31,85	22	1,45	-	-	-	-	-
	Total	1128,41	23	-	-	-	-	-	-
	Falta de ajuste	-	-	-	-	-	-	0,64	-
	Q^2	-	-	-	-	-	-	1,00	-
Resposta Global	Modelo	20,97	5	4,19	136,63	0,96	2,77	-	0,46
	Resíduo	0,55	18	0,03	-	-	-	-	-
	Total	21,52	23	-	-	-	-	-	-
	Falta de ajuste	-	-	-	-	-	-	0,02	-
	Q^2	-	-	-	-	-	-	1,00	-

*SQ-Soma dos quadrados, GL- Graus de liberdade, Q^2-Qui-quadrado.
Fonte: Autor (2018).

9.2.2 QUERCETINA

A quercetina foi extraída das folhas de *T. catharinensis* em maiores concentrações com o uso do solvente etanol a temperatura de 65 ºC e 60 minutos de extração. O gráfico de Pareto apresentado na Figura 13 demonstra que o fatores solvente, tempo e as interações tempo e temperatura, solvente e temperatura (p<0,05) foram significativos na extração do composto.



Reposta: Quercetina. X_1 solvente; X_2 tempo; X_3 temperatura. $X_1;X_2;X_3$: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Figura 13- Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração da quercetina.

Os efeitos das variáveis estudadas influenciaram a extração do composto fenólico quercetina. Segundo Spagolla et al. (2009) o extrato etanólico do mirtilo obteve maiores teores de compostos fenólicos o que está de acordo com o nosso estudo o qual demonstra que o solvente influencia a extração da quercetina.

O modelo de regressão multivariado para a quercetina apresentou um R^2 de 0,96 indicando que o modelo se ajusta aos dados experimentais observado pela Equação 4 e resposta superficial Figura 14 A,B,C.

$$\boldsymbol{Quercetina}\left(\frac{\boldsymbol{\mu g}}{\boldsymbol{g}}\right) = \mathbf{9,38} + \mathbf{9,37}\,\boldsymbol{X1} - \mathbf{1,21}\,\boldsymbol{X2} - \mathbf{1,21}\,\boldsymbol{X2}{:}\boldsymbol{X3} - \mathbf{1,70}\,\boldsymbol{X1}{:}\boldsymbol{X3}$$

Equação 4 - Equação garada para quercetina

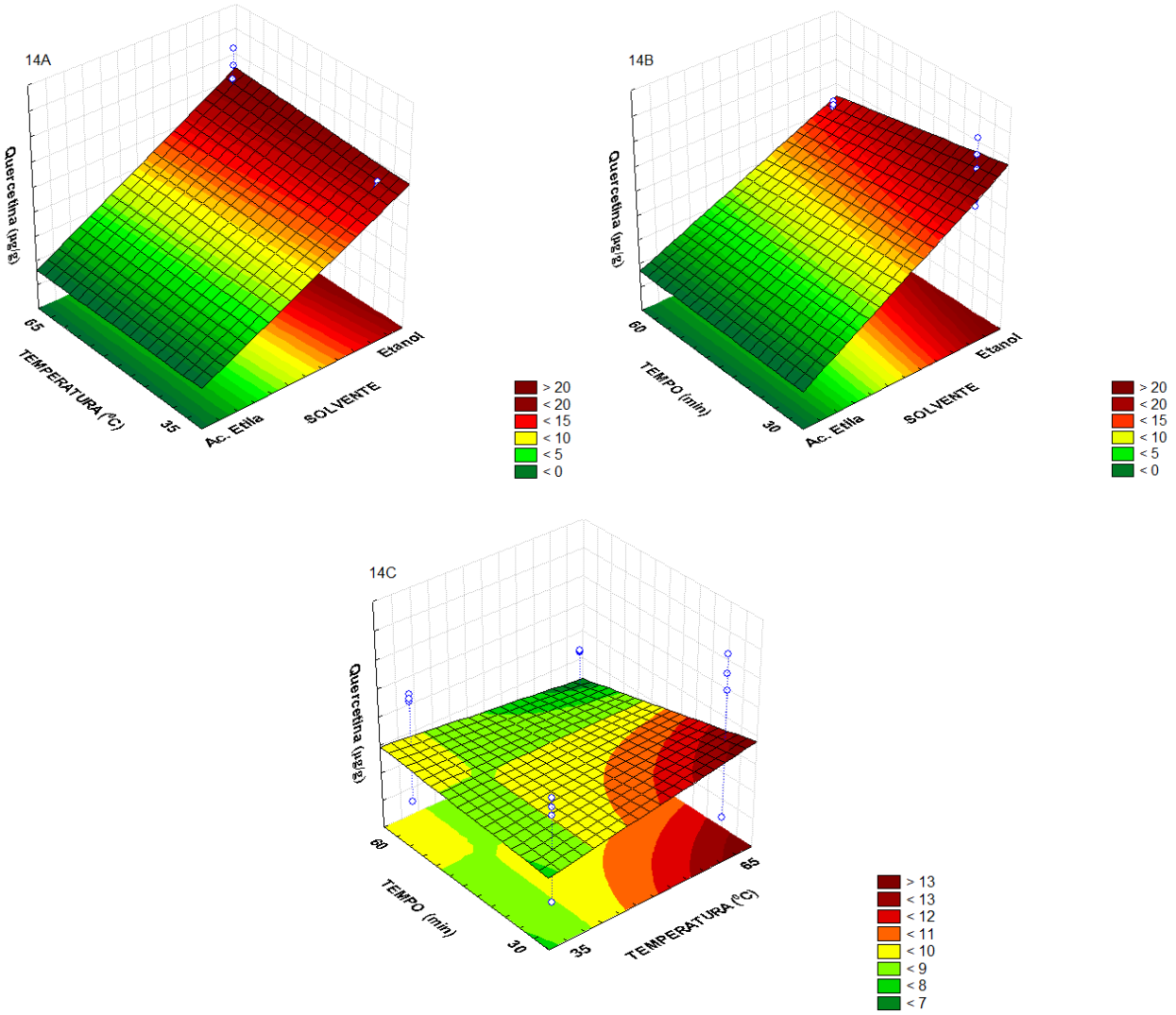
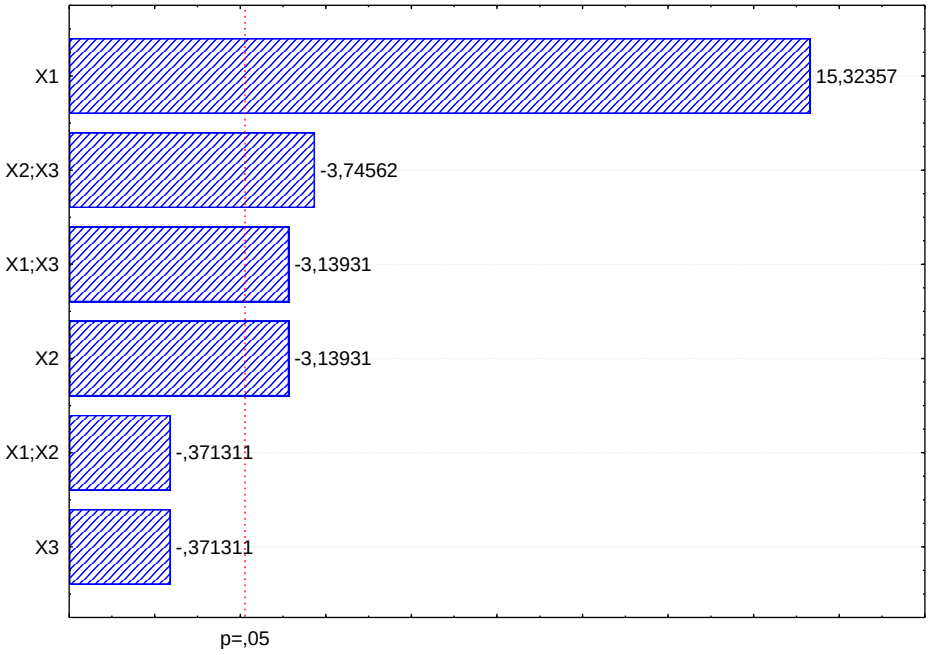


Figura 54 - Gráfico de Superfície referente à resposta do composto fenólico Quercetina.

9.2.3 RUTINA

A melhora da extração do composto fenólico rutina ocorre nas seguintes condições: temperatura (65 ^{0}C), tempo (60 min) e utilizando como solvente extrator o etanol. O gráfico de Pareto apresentado na Figura 15 demonstra que o fatores solvente, tempo e as interações tempo e temperatura, solvente e temperatura foram significativos (p<0,05) na extração do composto.



Reposta:Rutina. X_1 solvente; X_2 tempo; X_3 temperatura. X_1;X_2;X_3: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Figura 65 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração da rutina.

O modelo de regressão multivariado para a rutina apresentou um R^2 de 0,94 indicando que o modelo se ajusta aos dados experimentais observado pela Equação 5 e resposta superficial Figura 17A,B,C.

$$\boldsymbol{Rutina}\left(\frac{\boldsymbol{\mu g}}{\boldsymbol{g}}\right) = \mathbf{17,98} + \mathbf{17,98}\,\boldsymbol{X1} - \mathbf{3,68}\,\boldsymbol{X2} - \mathbf{3,68}\,\boldsymbol{X2}\mathbf{:}\boldsymbol{X3} - \mathbf{4,39}\,\boldsymbol{X1}\mathbf{:}\boldsymbol{X3}$$

Equação 5 - Equação gerada para rutina.

A rutina é um flavonóide que pertence à subclasse dos flavonóis no qual se apresenta como um dissacarídeo (raminose + glicose) ligados na posição 3 do anel pirano como se observa na Figura 16.

Segundo Alara et al. (2017) ao estudar as folhas de *Vernonia amygdalina* utilizando variação de temperatura de 60 a 80^0C e variação na concentração de etanol demonstraram que nestas condições de variáveis há contribuição para melhor extração dos flavonoides e compostos fenólicos, dados os quais estão de acordo com o estudado.

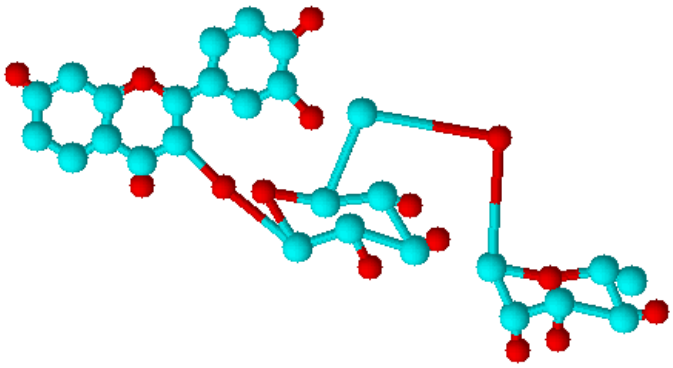


Figura 7 - Estrutura da rutina.

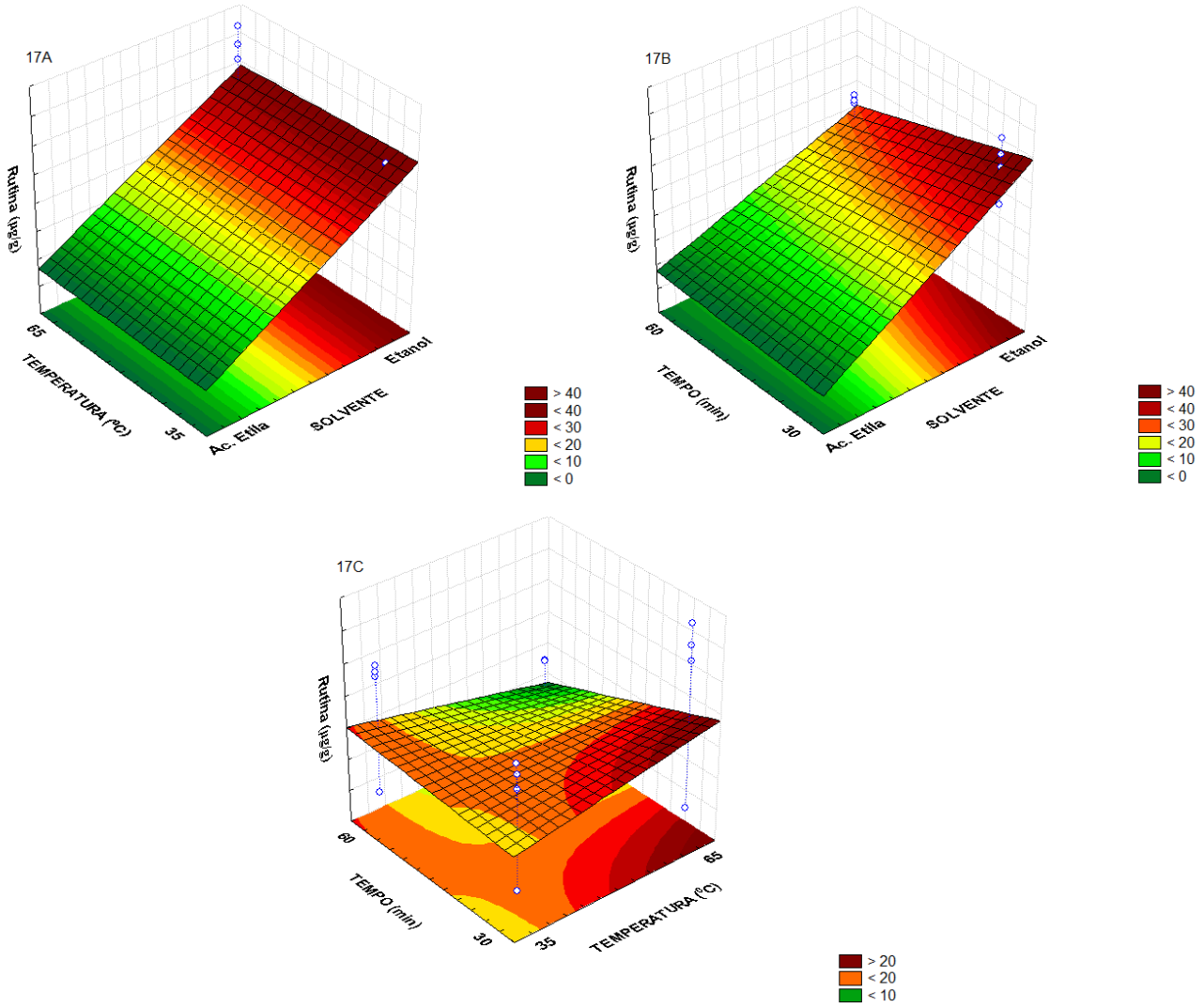
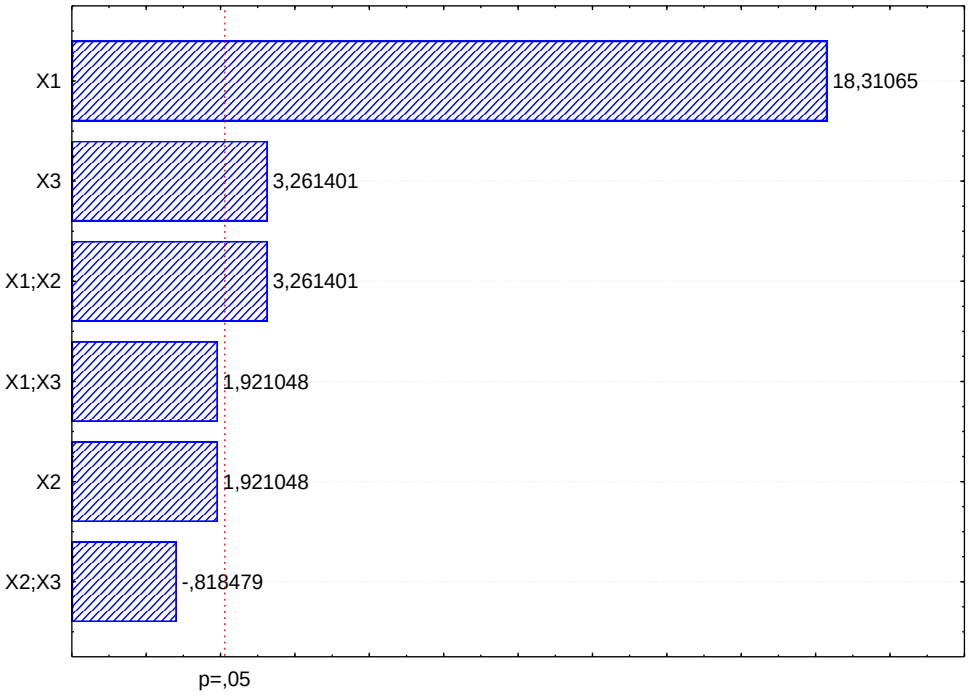


Figura 17 - Gráfico de Superfície referente à resposta do composto fenólico Rutina.

9.2.4 ÁCIDO FERÚLICO

O ácido ferúlico foi extraído em maiores concentrações com o uso do solvente etanol a temperatura de 65 ºC de extração. O gráfico de Pareto apresentado na Figura 18 demonstra que o fator solvente, temperatura e as interações solventes e tempo foram significativos (p<0,05) na extração do composto.



Reposta: Ácido ferulico. X_1 solvente; X_2 tempo; X_3 temperatura. $X_1;X_2;X_3$: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Figura 18 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração do ácido ferúlico.

O modelo de regressão multivariado para o ácido ferúlico apresentou R^2 de 0,95 indicando que o modelo se ajusta aos dados experimentais o que pode ser observado pela Equação 6 e resposta superficial na Figura 20A,B,C.

$$\text{Ác.}\boldsymbol{Ferulico}\ (\boldsymbol{\mu g/g}) = \mathbf{1,07} + \mathbf{1,07}\ \boldsymbol{X1} + \mathbf{0,19}\ \boldsymbol{X3}\ + \mathbf{0,19}\ \boldsymbol{X1X2}$$

Equação 6 - Equação gerada para o ácido ferúlico.

O potencial antioxidante do ácido ferúlico pode ser atribuído às suas características estruturais (Figura 19) a qual apresenta um núcleo fenólico com cadeia lateral insaturada com possibilidade de formar radical fenóxi e se estabilizar por ressonância promovendo desse modo o potente efeito antioxidante (SRINIVASAN et al., 2007).

Bitencourt et al. (2016) relata que o ácido ferulico atingiu valores maiores de solubilidade em etanol puro e com altas temperaturas. A tabela 7 demonstra os teores encontrados em nosso estudo os quais estão de acordo com Bitencourt et al. (2016) em que há maior afinidade do ácido ferulico com o solvente etanol ocasionando a melhor extração do composto.

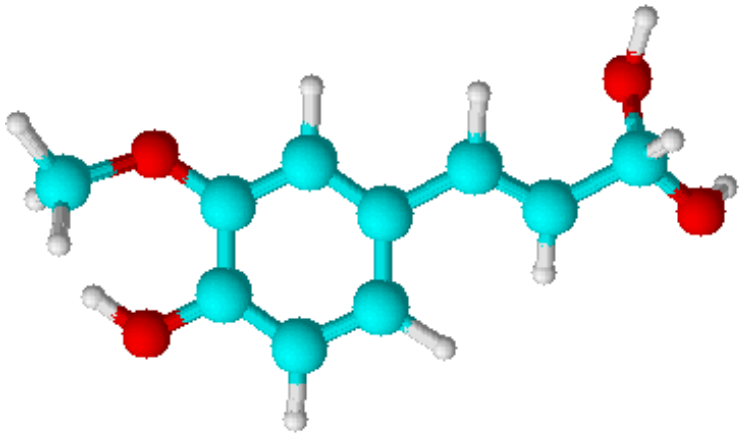


Figura 19- Estrutura do ácido ferúlico.

.

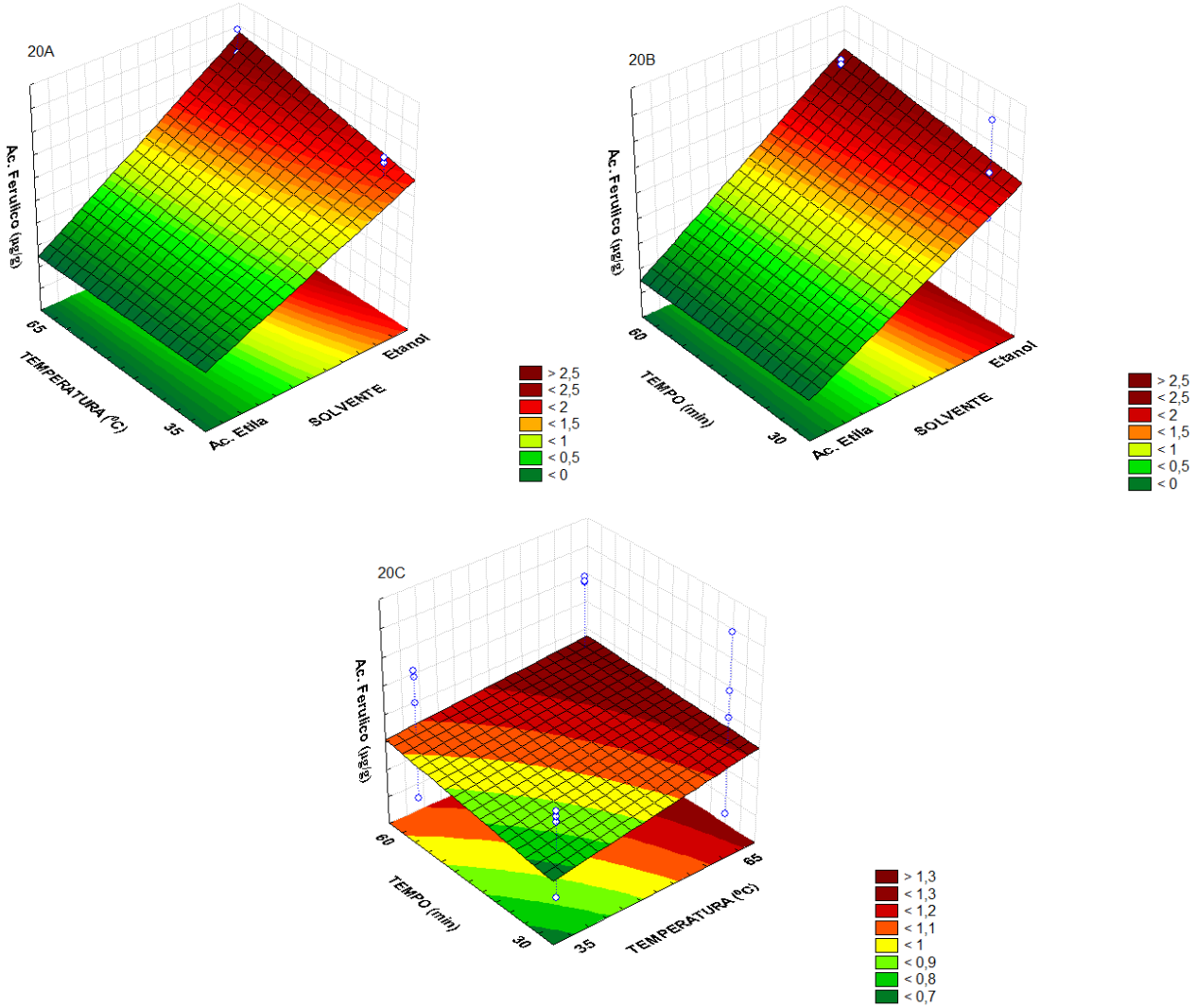
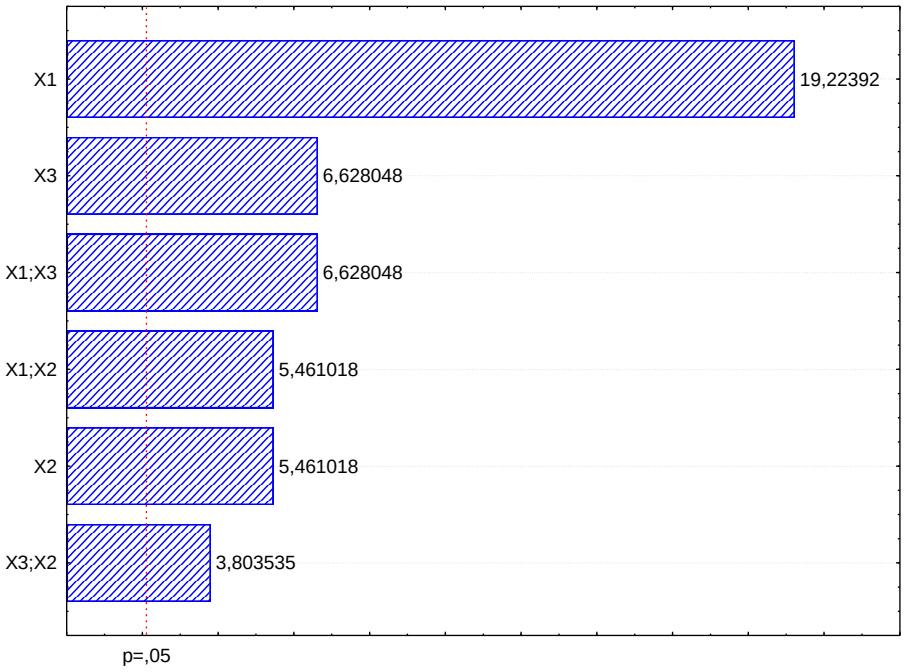


Figura 20 - Gráfico de Superfície referente à resposta do composto fenólico ácido ferúlico.

9.2.5 ÁCIDO CUMÁRICO

A melhora da extração do ácido cumárico ocorreu utilizando como solvente extrator o etanol. O gráfico de Pareto apresentado na Figura 21 demonstra que o fator solvente, tempo e temperatura e as interações solventes e temperatura, solvente e tempo, temperatura e tempo foram significativos (p<0,05) na extração do composto.



Reposta: Ácido cumárico. X_1 solvente; X_2 tempo; X_3 temperatura. $X_1;X_2;X_3$: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Figura 21 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração do ácido cumárico.

O modelo de regressão multivariado para o ácido cumárico apresentou R^2 de 0,97 indicando que o modelo se ajusta aos dados experimentais observado na Equação 7 e resposta superficial na Figura 22A,B.

$$\text{Ác.}\boldsymbol{Cumarico}\left(\frac{\mu g}{g}\right) = \mathbf{1,37} + \mathbf{1,37}\,\boldsymbol{X1} + \mathbf{0,47}\,\boldsymbol{X3} + \mathbf{0,39}\,\boldsymbol{X2} + \mathbf{0,47}\,\boldsymbol{X1}:\boldsymbol{X3} + \mathbf{0,39}\,\boldsymbol{X1}:\boldsymbol{X2} + \boldsymbol{X3}:\boldsymbol{X2}$$

Equação 7 - Equação gerada para ácido cumárico.

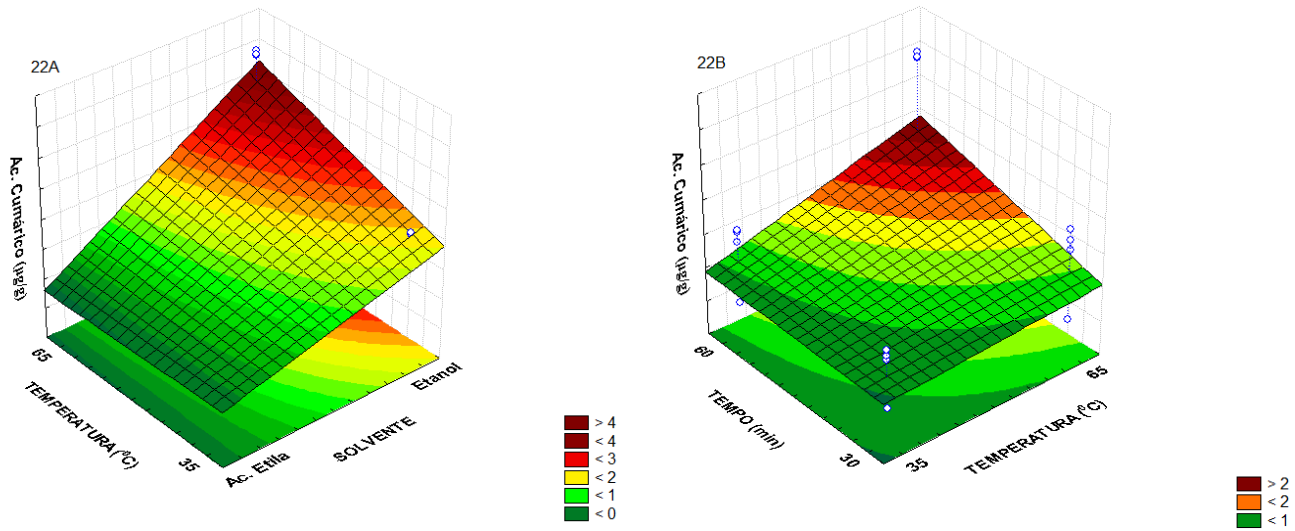


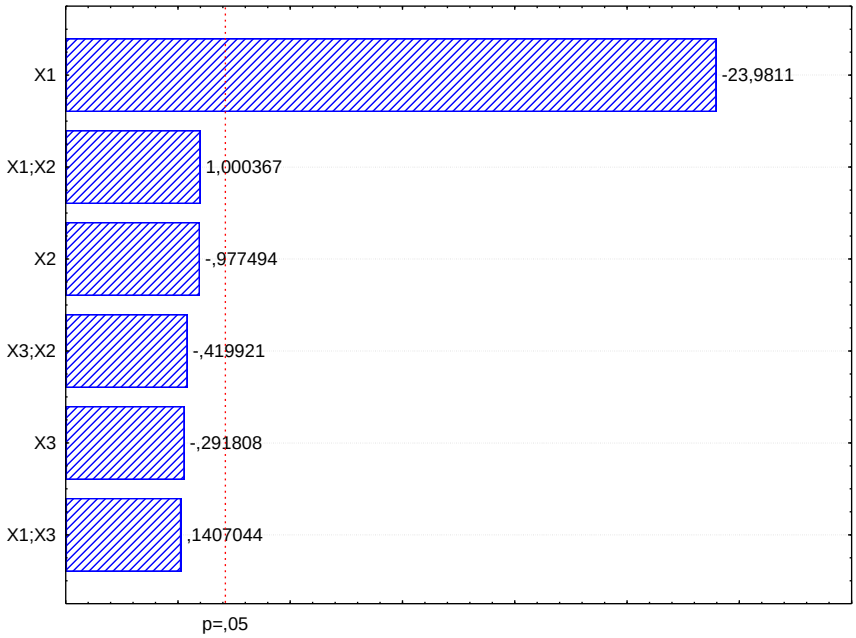
Figura 22 - Gráfico de Superfície referente à resposta do composto fenólico ácido cumárico.

9.2.6 PINOCEMBRINA

O modelo de regressão multivariado para a pinocembrina apresentou R^2 de 0,97 observado pela Equação 8 e resposta superficial na Figura 24. Assim como os demais compostos fenólicos deste estudo, a pinocembrina variou seu teor conforme as condições empregadas a qual apresentou melhora na extração quando utilizado como solvente extrator o acetato de etila.

Segundo Belke et al. (2011) os solventes menos polares recuperam as agliconas livres tais como as flavononas (pinocembrina), flavonóis e flavonas. A redução da extração do composto é confirmada quando comparado à extração da pinocembrina utilizando solvente de maior polaridade (etanol) do que um de menor polaridade (acetato de etila) (Tabela 7).

O gráfico de Pareto apresentado na Figura 23 demonstra que o fator solvente foi significativo (p<0,05) na extração do composto.



Reposta: Pinocembrina. X_1 solvente; X_2 tempo; X_3 temperatura. X_1;X_2;X_3: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Figura 23 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para extração da pinocembrina.

O modelo de regressão multivariado para o ácido cumárico apresentou um R^2 de 0,97 indicando que o modelo se ajusta aos dados experimentais observado pela Equação 8 e resposta superficial na Figura 24A,B.

$$\boldsymbol{Pinocembrina}\left(\frac{\boldsymbol{\mu g}}{\boldsymbol{g}}\right) = \mathbf{8,31} - \mathbf{6,74}\ \boldsymbol{X1}$$

Equação 8 - Equação gerada para pinocembrina.

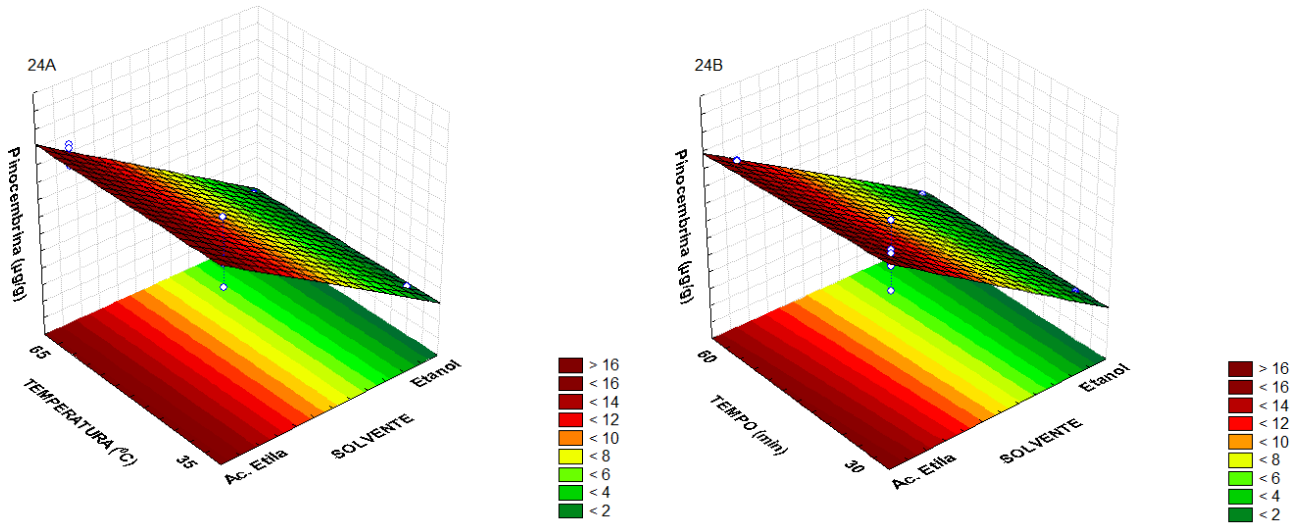
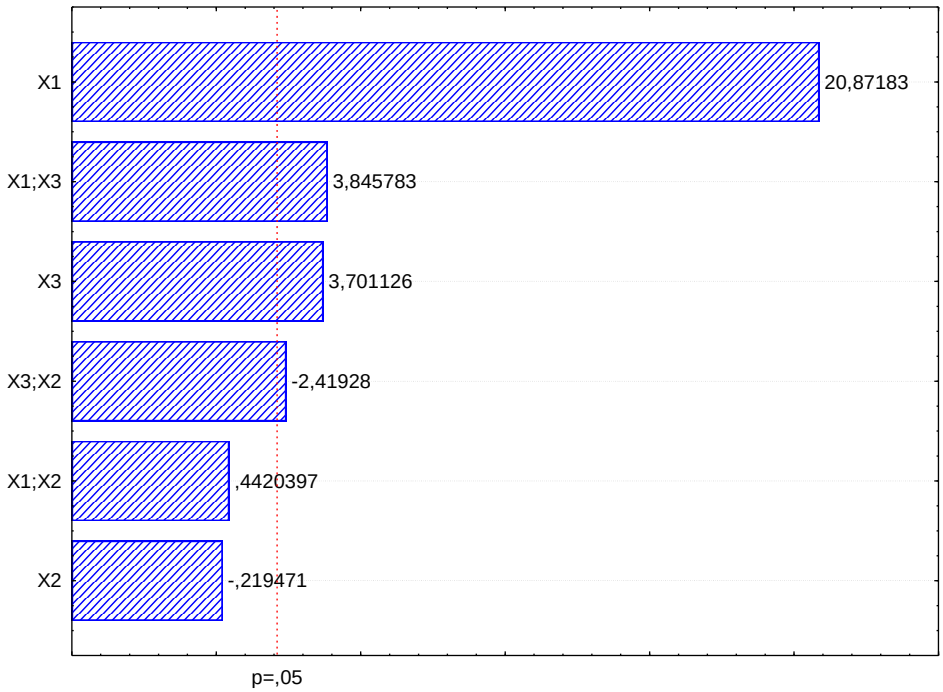


Figura 8 - Gráfico de Superfície referente à resposta do compostos fenólico pinocembrina.

9.2.7 Resposta Global

Importante salientar a análise multivariada de forma global que se refere a todos os métodos estatísticos que analisa simultaneamente as múltiplas medidas do nosso objeto de investigação. Essa resposta global do modelo de regressão multivariada apresentou R^2 de 0,96 o qual pode ser observado pela Equação 9 e resposta de superfície nas Figuras 26 A,B,C. Essa análise evidencia que as melhores condições de extração dos compostos fenólicos de *T. catharinensis* ocorre sob temperatura 65 ^{0}C, tempo 60 min utilizando solvente extrator etanol.

O gráfico de Pareto apresentado na Figura 25 demonstra que o fator solvente, temperatura e as interações solvente e a temperatura, tempo e temperatura foram significativos (p<0,05) na extração dos compostos.



Reposta: Resposta Global. X_1 solvente; X_2 tempo; X_3 temperatura. X_1;X_2;X_3: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância. p<0,05.

Figura 25 - Gráfico de Pareto mostrando os fatores significativos (p<0,05) para resposta global.

$$\boldsymbol{Resposta\ Global}\left(\frac{\mu g}{g}\right) = 1,66 + 0,89\,X1 + 0,15\,X3 + 0,16\,X1{:}X3 - 0,10\,X3{:}X2$$

Equação 9 - Equação gerada para a resposta global.

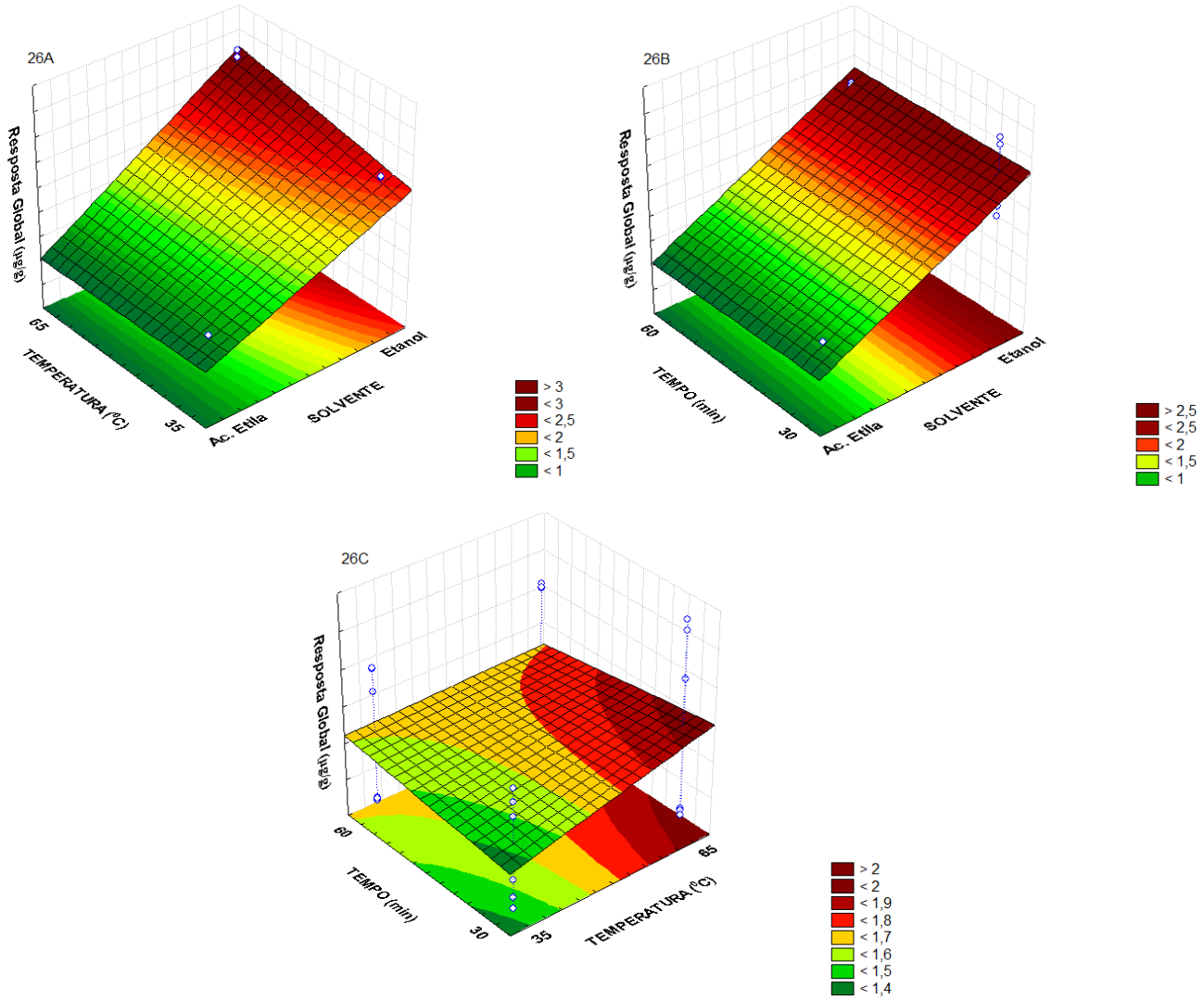


Figura 9 - Gráfico de superfície referente à resposta global.

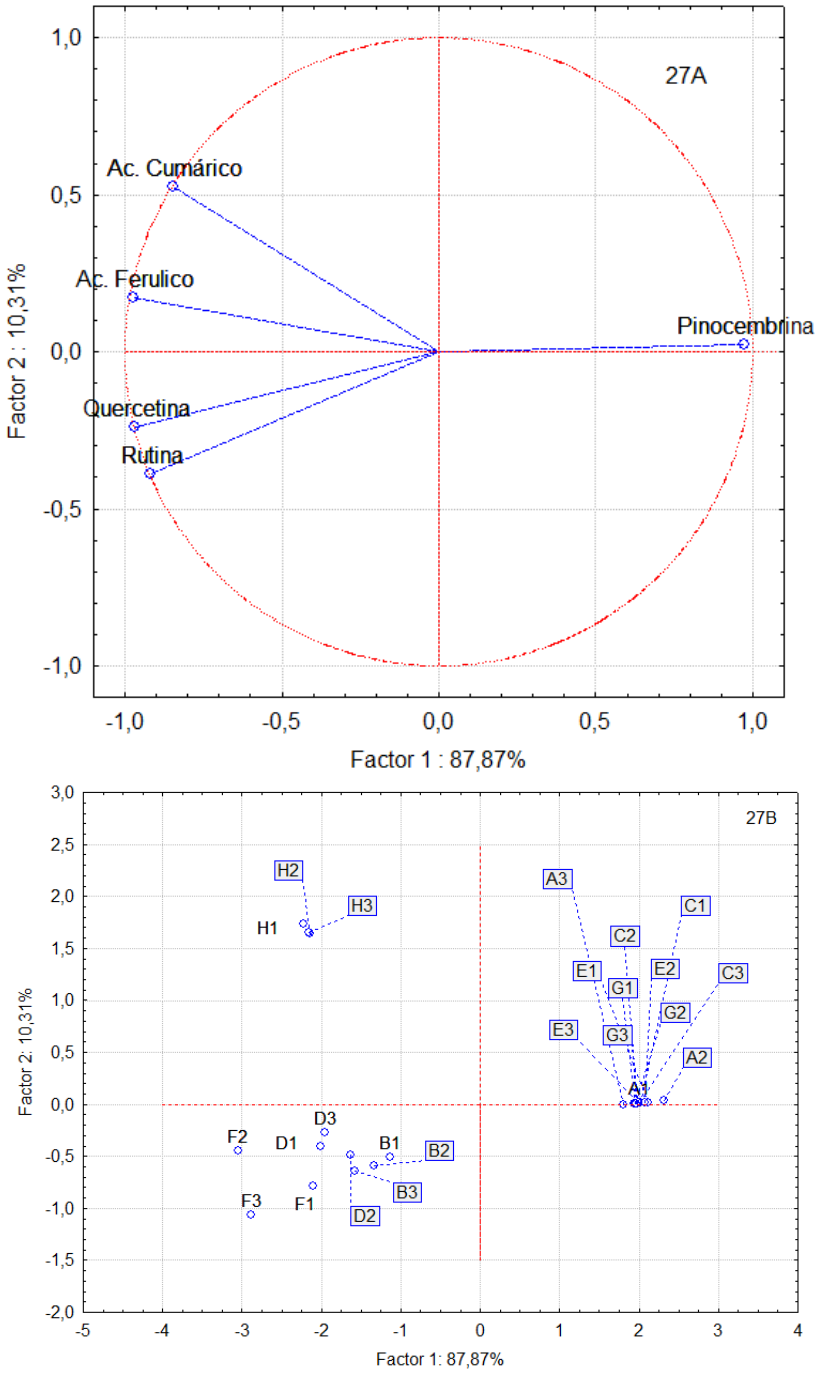


Figura 27 - Gráfico de PCA: Efeitos de fatores de tempo e temperatura na conversão de compostos fenólicos: a) pontuações b) gráfico de carga para compostos fenólicos.

Com o intuito de melhorar os resultados dos dados estatísticos e através da análise multivariada para o teor de extração de compostos fenólicos denominada de análise de componentes principais (PCA) a qual fornece informações mais

relevantes. Brevemente, a PCA é uma ferramenta na qual consiste em mudança de base dos dados multivariados que contém histogramas médios das imagens digitalizadas para cada categoria, sendo um subsistema capaz de reter informações que representam de modo mais adequado cada variável individualmente (Godinho et al., 2008).

A PCA demonstra que dois principais componentes foram identificados, explicando 98,18 % de variabilidade total, PC1 87,87% e PC2 10,10% de variação em que as correlações com as variáveis de entrada são apresentadas nas Figuras 27 a,b. O grupo formado pelos compostos fenólicos ácido cumárico, ácido ferulico (segundo quadrante figura 27a) foi fortemente influenciado pelo solvente etanol, aquecimento de 65^{0}C e por um tempo de 60 min. O grupo representado pelo composto fenólico quercetina e rutina (terceiro quadrante figura 27a) demonstram serem influenciados em sua extração pelo solvente etanol, aquecimento de 35 e 65 ^{0}C e por tempo de 30 e 60 min.

O grupo representado pelo composto fenólico pinocembrina, (primeiro quadrante figura 27a) foi fortemente influenciado pelo solvente acetato de etila, aquecimento de 35 e 65 ^{0}C e por um tempo de 30 e 60 min. A análise dos componentes realizados nos conjuntos dos compostos fenólicos foi eficiente e contribuiu para a identificação da otimização do teor de extração dos compostos fenólicos nos diferentes ensaios testados em que o extrato A8 demonstrou ser a melhor condição de extração.

10. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DA MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO (EXTRATO A8)

Após todas as análises para identificar a melhor condição de extração avaliou-se as atividades antioxidantes nos métodos *in vitro*: compostos fenólicos totais, DPPH, FRAP, ABTS e β-Caroteno. Somente foi utilizado nos testes antioxidantes o extrato A8 (etanol, 60 min, 65 ^{0}C) da *T. catharinensis* que demonstrou ser a melhor condição de extração de compostos fenólicos.

O extrato A8 da *T. catharinensis* apresentou teor de compostos fenólicos totais 23,34 mg de EAG/g^{-1} (Tabela 9) o qual é inferior aos teores encontrados por BOLIGON et al. (2013) com valores variando entre 135,57 a 562,780 mg de EAG/g^{-1}. Pode-se sugerir que o baixo teor de extração do nosso estudo é devido aos fatores de extração que utiliza diferentes solventes extratores, locais e épocas distintas de coleta das folhas que alteram a composição fitoquímica da planta.

A determinação da atividade antioxidante DPPH do extrato A8 apresentou neste estudo teor de 34,26 µmol de Trolox (Tabela 9). Os resultados encontrados diferem dos teores encontrados por ARBELÁEZ-HOYOS et al. (2018), que relataram teores da capacidade antioxidante DPPH da fruta manga variando entre 65,57 a 773,72 µmol/g. O poder da atividade redutora (FRAP) do extrato de *T. catharinensis*, apresentou teor de 24,13 µmol Fe^{2+} (Tabela 9). Os resultados encontrados foram inferiores ao encontrado por ALMEIDA et al. (2018) que ao estudar o extrato hidroalcoólico das folhas de kiwi encontrou teor de 3076,35 umol Fe^{2+}. A determinação da atividade antioxidante ABTS do extrato A8 apresentou teor de 12,57 umol Trolox (Tabela 9) o qual é teor inferior quando comparado a WAN et al. (2016) que relata teor de 108,85 µmol para as folhas de *Artemisia annua L.*

As atividades de oxidação acoplada ao β-Caroteno e ácido linoleico do extrato A8 apresenta teor superior (78,85 AA (%); Tabela 9) ao encontrado por SOUZA DE SÁ et al. (2012) o qual relata valores que variam de 17,61 a 41,20 AA (%) que estudou as partes aéreas da cana de açúcar.

Importante salientar que a diferença entre os teores fenólicos e a capacidade antioxidante do extrato em nosso estudo são comparados com espécies diferentes da *T. catharinensis.* A falta de estudos das folhas *T. catharinensis* nas mesmas

condições metodológicas demonstra, aparentemente, que o teor de fenólicos e a capacidade antioxidante sejam inferiores ao kiwi, manga e *Artemisia annua*, mas na verdade é que cada espécie possui característica própria de produção de fitoquímicos. Além disso, as diferenças metodológicas empregadas na extração dos compostos como a escolha do solvente extrator, o local em que a planta se encontra, o tipo de solo, a porção da planta utilizada para o estudo, a genética da espécie e o clima podem alterar significativamente a quantidade de compostos fitoquímicos presentes na planta.

Entretanto, apesar da baixa atividade antioxidante o extrato da *T. catharinensis* apresenta excelentes compostos antoxidantes capazes de atuar contra possíveis agentes oxidantes.

Tabela 9 - Atividade antioxidante da melhor condição de extração.

Atividades Antioxidantes	***Tabernaemontana catharinensis***
Compostos fenólicos	23,34±0,03 mg de EAG/g-1
DPPH	34,26±1,17 µmol de Trolox
FRAP	24,13±0,04 µmol Fe 2^{+}
ABTS	12,57±0,66 µmol Trolox
β-caroteno/ácido linoleico	78,85±0,67 AA (%)

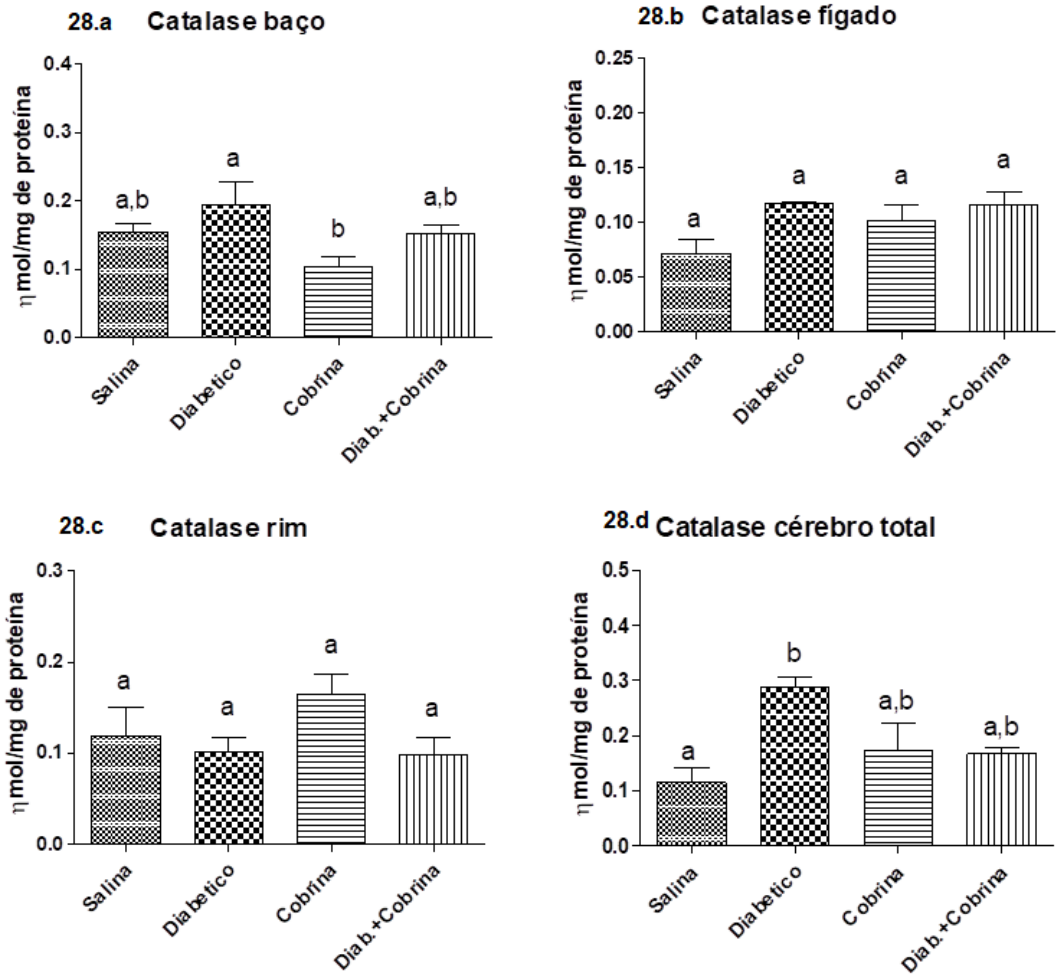
Fonte: Autor (2018).

11 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO *EX VIVO* EM MODELO ANIMAL DE DIABETES

No presente estudo os níveis da atividade catalase somente aumentaram significativamente no cérebro total de ratos diabéticos quando comparados ao grupo salina (Figura 28.d). Pode-se sugerir que este aumento da atividade da enzima corresponde as alterações metabólicas da diabetes induzida por estreptozotocina a qual aumenta a atividade enzimática devido ao estresse oxidativo causado no tecido (Figura 28.d). Segundo KAKKAR et al. (1995) e LEE et al. (2018) o aumento da atividade da catalase pode ser devido a maior produção de H_2O_2 e juntamente com a hipoinsulinemia ocorre aumento da atividade da enzima acetil Co-A que inicia a β-oxidação dos ácidos graxos, resultando na produção de H_2O_2. Esta produção de H_2O_2 ocorre pelo mecanismo de conversão de radicais superóxidos $O_2^{-\cdot}$ em peróxido de hidrogênio através da atuação da superóxido dismutase em que no passo seguinte o peróxido de hidrogênio é decomposto em água e oxigênio molecular pela atuação da enzima catalase (YENKOYAN et al., 2018).

No tecido de baço o extrato das folhas de *T. catharinensis* não teve ação antioxidante suficiente para diminuir significativamente em nível do controle a atividade da catalase no modelo de diabetes (Figura 28.a). Pode-se sugerir que o aumento na dose administrada aos animais diabéticos possivelmente possam ter efeito positivo de combate ao estresse oxidativo neste modelo experimental devido às características dos compostos fitoquímicos presentes na planta estudados na sessão *in vitro*.

Figura 28 a-d. Atividade da enzima catalase nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6). Os resultados são expressos em ηmol/mg de proteína.



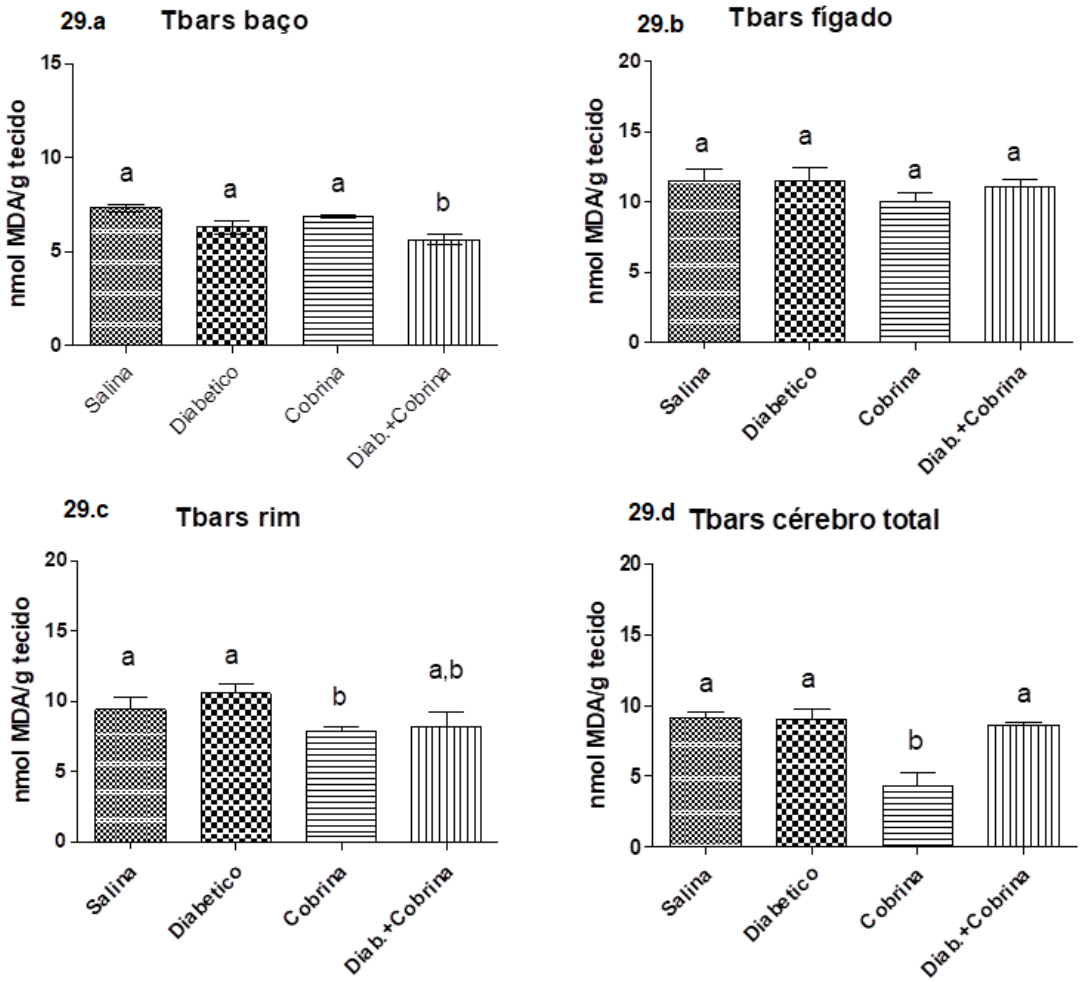
Em resposta à análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não houve alterações significativas nos tecidos estudados quando comparado o grupo salina e com o grupo diabético (Figura 29 a.b.c.d).

A planta *per se* apresentou diferença significativa do nível do TBARS nos tecidos do rim e do cérebro total quando comparados o grupo diabético e com o grupo cobrina (Figura 29.c, 29.d). Pode-se sugerir que esta diminuição da peroxidação lipídica no tecido do rim e do cérebro total corresponda à ação dos agentes antioxidantes presentes nas folhas da *T. catharinensis*. Belhling et al. (2004) afirmam que a quercetina possui alto potencial antioxidante e seus efeitos protetores podem atuar sob o sistema renal a qual está presente no extrato da planta em estudo além da rutina, ácido ferrúlico, ácido cumárico e pinocembrina.

Moreira et al. (2004) afirmam que ao verificar a ação de extratos de diferentes ervas, mostarda, canela e erva doce sob a peroxidação lipídica em tecidos de ratos como o fígado, o cérebro, o coração, o tecido adiposo e os rins observou redução nos níveis de TBARS indicando efeito inibitório da peroxidação lipídica. Este efeito é devido à presença de compostos fenólicos o qual apresentam atividade quelante de metais. Em nosso estudo pode-se observar queda significativa dos níveis de TBARS no rim e no cérebro total nos grupos tratados com a planta *per se* quando comparados com o grupo diabético o que indica que o extrato etanólico das folhas de *T. catharinensis* possui efeito antioxidante nesses tecidos, mas não suficiente para diminuir a peroxidação quando submetidos ao modelo experimental de diabetes.

No tecido do Baço houve diminuição significativa na peroxidação lipídica no grupo diabetes + cobrina quando comparado com os demais grupos (Figura 29.a) demonstrando que as folhas da *T. catharinensis* pode combater os radicais livres no baço de animais diabéticos.

Figura 29 a-d - Atividade da peroxidação lipídica (TBARS) nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6). Os resultados são expressos em nmol MDA/ g de tecido.



*p<0,05, Fonte: Do autor.

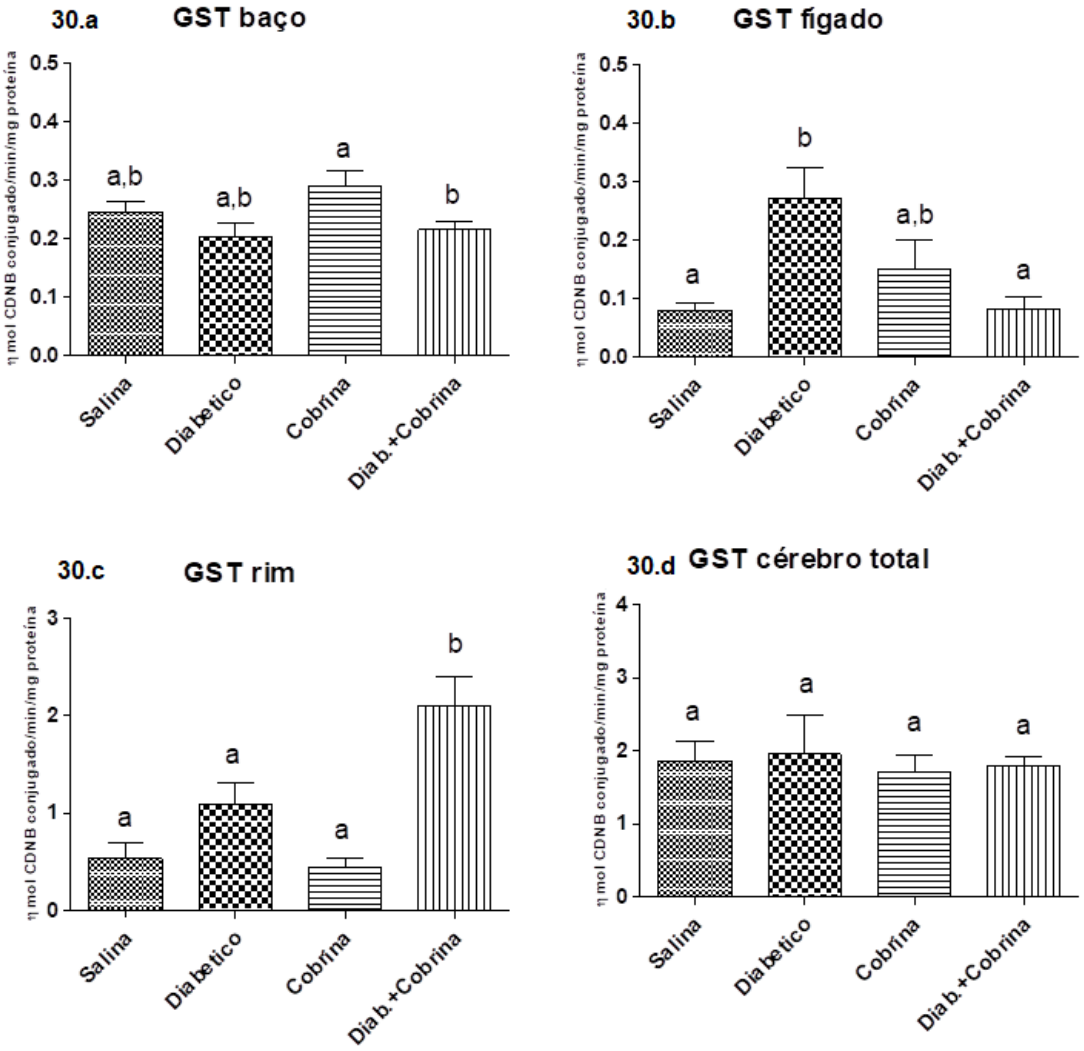
Os resultados da atividade enzimática da Glutationa S-transferase (GST) no tecido de baço somente houve diminuição significativa no grupo diabetes + cobrina quando comparado ao grupo cobrina (Figura 30.a). Pode-se sugerir que o estresse oxidativo aumenta a atividade da enzima no baço quando o extrato A8 da melhor condição de extração das folhas de *T. catarinenses* é administrado via oral na dose de 300mg/kg.

No tecido fígado (Figura 30.b) houve aumento significativa da atividade da GST no grupo diabetes quando comparado ao grupo salina e o grupo diabete + cobrina. Segundo Moraes (2013) a diminuição da atividade da GST observada no grupo contendo o tratamento mais a patologia está relacionada com a redução da disponibilidade da GSH. Pode-se sugerir que o extrato A8 da *T. catharinensis* na dose de 300mg/kg no fígado possui ação antioxidante no combate ao estresse oxidativo diminuindo a atividade da enzima.

No tecido do rim (Figura 30.c) houve aumento significativo da GST no grupo diabetes + cobrina quando comparado aos grupos cobrina, diabetes e salina. Pode-se sugerir que a planta no tecido de rim é capaz de aumentar o estresse oxidativo quando administrada aos animais com diabetes induzidas por estreptozoticina. Estes resultados estão de acordo com Boni et al. (2011) que utilizou extrato hidro alcoólico de T. *catharinensis* e demonstrou que o tratamento de 500 mg/kg altera parâmetros bioquímicos com alterações histológicas no rim.

.

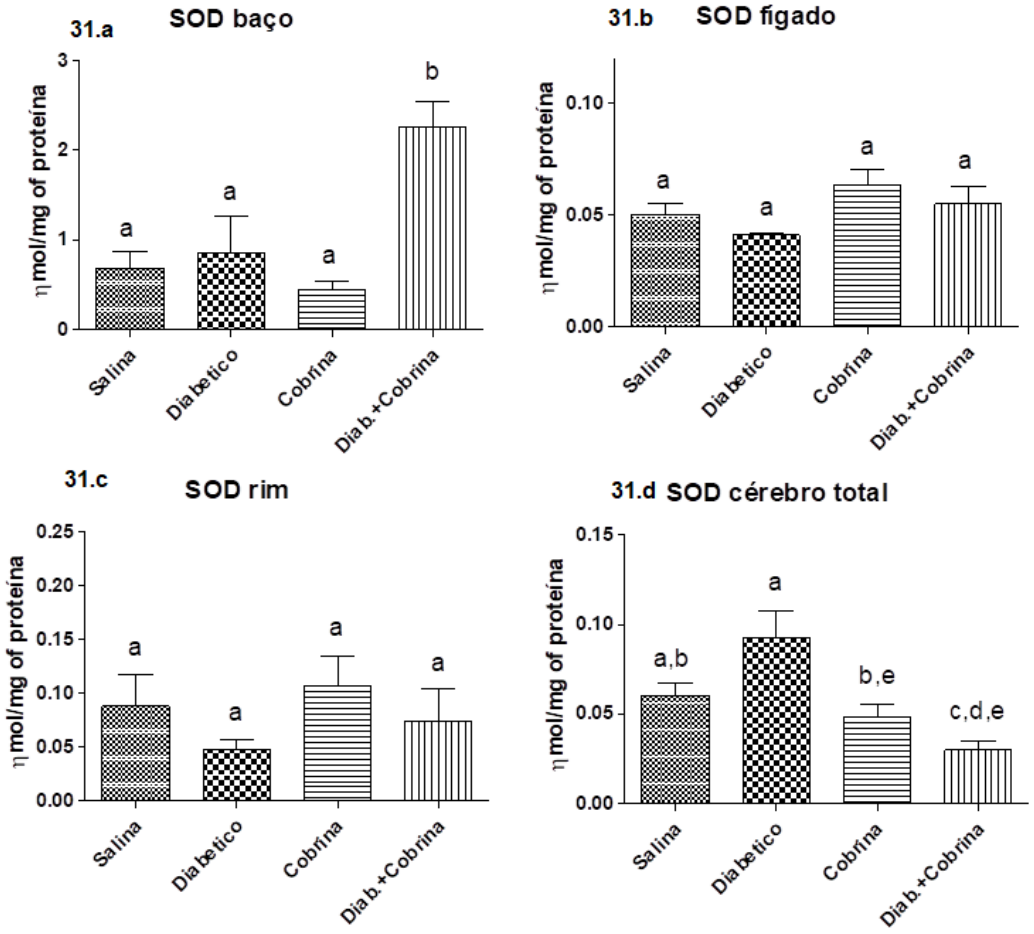
Figura 30 a-d - Atividade da atividade enzimática da glutationa S-transferase nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6).



A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) não houve alteração significativa para os tecidos de rim (Figura 31c) e fígado (Figura 31b). Os resultados demonstram que houve aumento significativo da SOD no tecido baço (Figura 31.a) no grupo diabético+cobrina quando comparado aos demais grupos. Este aumento da atividade da enzima está relacionado com o aumento do extresse oxidativo no diabetes quando submetido ao tratamento demonstrando que o extrato A8 da planta pode ser tóxico para o baço na dose de 300 mg/kg. Rongrong et al. (2009) relata que o estresse oxidativo pode aumentar a atividades de importantes enzimas como a SOD que combate a exacerbada produção de radicais hidroxila causando danos irreversíveis ao tecido como a fragmentação de DNA e a desnaturação das proteínas.

No tecido de cérebro total (Figura 31.d) houve diminuição significativa na atividade da SOD no grupo diabetes + cobrina quando comparado aos grupos controle e diabético e no grupo cobrina quando comparado ao grupo diabético. Pode-se sugerir que a administração da planta em estudo promove e possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e possuir efeito positivo combatendo o estresse oxidativo. Estes resultados estão de acordo com Lehmann et al. (2015) que ao estudar os efeitos antioxidantes da fração acetato de etila do extrato de *T. catharinensis* em plasma de *rattus novergicus* verificou que o grupo diabético tratado com 80mg/Kg de *T. catharinensis* diminuiu significativa a atividade da SOD quando comparado com o grupo controle diabético.

Figura 31 a-d - Gráficos da atividade enzimática da superóxido dismutase nos grupos salina, diabético, cobrina e diabético + cobrina nos tecidos de baço, fígado, rim e cérebro total de ratos Wistar. Barras representam médias ± SEM. Os iconogramas com letras iguais são estatisticamente iguais e iconogramas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Anova de uma via, p <0,05 n=6). Os resultados são expressos em nmol/mg de proteína.



12 CONCLUSÃO

De acordo com o disposto acima os resultados deste trabalho indicam que os extratos etanólicos das folhas de *T. catharinensis* apresentam teores de compostos fenólicos em baixas concentrações especialmente a quercetina, rutina, ácido ferulico, ácido cumárico e pinocembrina quando comparados a outras plantas.

A otimização da extração de compostos fenólicos das folhas da *T. catharinensis* demonstrou que através da análise de variância de uma via utilizando a metodologia de superfície de resposta somada ao conjunto de dados dos componentes principais e pela resposta global relacionados com a variável temperatura, tempo e solvente foi possível aperfeiçoar a extração dos compostos presentes no extrato das folhas de *T. catharinensis.* Pode-se sugerir que o solvente etanol extrai com maior eficiência os compostos fenólicos em temperatura a 65 ºC e tempo de 60 min. O delineamento fatorial permitiu a redução do número de ensaios realizados sem que haja perda da qualidade metodológica e que a metodologia desenvolvida é promissora para a extração dos compostos fenólicos de *T. catharinensis.*

As consideráveis atividades antioxidantes in vitro do extrato A8 (etanol, 65 ^{0}C, 60 min), DPPH, FRAP, ABTS e oxidação acoplada ao β-caroteno e ácido linoleico além da quantidade de compostos fenólicos totais presentes no extrato, possuem potencial antioxidante o qual devem ser alvos de futuras pesquisas visando o isolamento destes compostos fitoquímicos, para então aplicação como antioxidantes exógenos em sistemas *in vivo*.

Os resultados obtidos do modelo experimental animal de diabetes induzidos por estreptozotocina demonstram alteração do sistema antioxidante endógeno e quando submetido ao tratamento com a planta *T. catharinensis*. O extrato otimizado A8 das folhas de *T. catharinensis* na dose de 300 mg/kg administrado via gavagem promoveu diminuição da peroxidação lipídica no baço, rim e cérebro total. A ação da planta contra o estresse oxidativo somente houve efeito benéfico no fígado e cérebro total de ratos, e demonstrou ser tóxica para o tecido de rim e baço com aumento dos marcadores de estresse oxidativo GST e SOD.

Embora as concentrações de antioxidantes da planta demonstrem ser relativamente baixas pode-se sugerir ligeira melhora no conteúdo oxidativo no tecido de fígado e cérebro total. No entanto, não se esperava determinada toxicidade para os tecidos de rim e baço o que se pode sugerir aumento de estresse oxidativo nesses tecidos causados pela administração da planta. Estas atividades estão relacionadas com a constituição fitoquímica da planta a qual pode conter compostos tóxicos. Porém, pesquisas adicionais serão necessárias para melhor avaliação desta espécie da família Apocynaceae no modelo experimental de diabetes e a identificação de possíveis compostos tóxicos.

13 REFERÊNCIAS

AGUILAR-HERNÁNDEZ, I.; AFSETHB, N.K.; LÓPEZ-LUKEC, T.; CONTRERAS-TORRESA, F.F.; WOLDB, J.P.; ORNELAS-SOTOA, N. Surface enhanced Raman spectroscopy of phenolic antioxidants: A systematic evaluation of ferulic acid, p-coumaric acid, caffeic acid and sinapic acid. **Vibrational Spectroscopy** v. 89,113–122, 2017.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7286-7292, nov. 2004.

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N.H.; OLALERE, O.A. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from Vernonia amygdalina leaf using two-level factorial design. **Journal of King Saud University** – Science, 2017.

ALMEIDA, D.; PINTO, D.; SANTOS, J.; VINHA, A.F.; PALMEIRA, J.; FERREIRA, H.N.; RODRIGUES, F.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Hardy kiwifruit leaves (Actinidia arguta): An extraordinary source of valueadded compounds for food industry. **Food Chemistry**, Vol. 259, 113–121, 2018.

ALMEIDA, J.M.D.; SANTOS, R.J.D.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos Para Determinação De Atividade Antioxidante In Vitro em Substratos Orgânicos. **Química Nova**, Vol. 33, No. 10, 2202-2210, 2010.

ARBELÁEZ, J.H.; NARANJO, L.B.; VÁZQUEZ, M.; CALDERÓN, J.C. Antioxidant

capacity of mango fruit (Mangifera indica). An electrochemical study as an approach to the spectrophotometric methods, **Food Chemistry**, Vol. 266, 435–440, 2018.

BAHAMONDE, C.; CONDEA, C.; AGÜERA, E.; LILLO, R.; LUQUE, E.; GASCÓN, F.; FEIJÓO, M.; CRUZ, A.H.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, F.; TÚNEZ. I. Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Relationship to oxidative stress. **European Journal of Pharmacology** 730:26–30, 2014.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, vol.29, no.1 São Paulo Jan./Feb. 2006.

BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v.48, n.1, p. 1-9, 1999.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutin – Estructure, Metabolism And Pharmacological Potency. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21 - 25, 2009.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES. L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas**. Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BELKE, B.V.; PIANA, M.; BOLIGON, A.A.; ZADRA, M.; FRÖHLICH, J.K.; BRUM, T.F.; ATHAYDE, M.L. Doseamento De Flavonóides Nos Ramos De Tabernaemontana Catharinensis A. Dc. **Revista Contexto & Saúde** v. 10 n. 20, 2011.

BITENCOURT, R.G.; CABRAL, F.A.; MEIRELLES, A.J.A. Ferulic acid solubility in supercritical carbon dioxide, ethanol and water mixtures**. J. Chem. Thermodynamics** v.103, p. 285–291, 2016.

BOLIGON, A. A.; PIANA, M.; KUBIÇA, T.F.; MARIO, D.N.; DALMOLIN, T.V.; BONEZ, P.C.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S.H.; CAMPOS, M.M.A; ATHAYDE, M.L. HPLC Analysis And Antimicrobial, Antimycobacterial And Antiviral Activities Of Tabernaemontana Catharinensis A. DC. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 7–18, 2014.

BOLIGON, A.A.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; PIANA, M.; BELKE, B.V.; ROCHA, J.B.T.; ATHAYDE, M.L. Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of Tabernaemontana catharinensis A. DC. **Free Radicals and Antioxidants**. p. 1-3, 2013.

BONI, A.P.; ZENI, A.L.B.; ALBURQUERQUE, C.A.C. Effect of hydroalcoholic extract of Tabernaemontana catharinensis in mice experimentally inoculated with bothropic venom. **Rev. Bras. Farm.** v.92 p.176-185, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**., v. 72, p. 248, 1951.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M E; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm - Wiss Technol**., v. 28, p. 25–30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BRUM, E.D.S.; MOREIRA, L.D.R; SILVA, A.R.D.D.S.; BOLIGON, A.A.; CARVALHO, F.B.; ATHAYDE, M.L.; BRANDÃO, R.; OLIVEIRA, S.M. Tabernaemontana Catharinensis Ethyl Acetate Fraction Presents Antinociceptive Activity Without Causing Toxicological Effects In Mice. **Journal of Ethnopharmacology**, junho, 2016

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A .; CACCIALANZA, G. MASSOLINI, G. Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plant Resources:The Role Of Analysis In The Ethnopharmacological Approachg. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 218 – 228, 2014.

CHANDRASEKARA, A. Phenolic Acids. **Reference Module in Food Science,** 2018.

CORTESE, M. M.; SUSCHEK, C.V.; WETZEL, W.; KRONCKE, K.D.; KOLB-BACHOFEN, V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2 -dependent stimulation of glutathione biosynthesis**. Free Radic. Biol. Med**., v. 44, p. 2002-2012, 2008.

ELLMAN, G.L. Tissue sulphydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 82:70-77, 1959.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. ed. São Paulo, SP: Atheneu, p. 652. 2009.

FANG, S.C.; XIE, H.; CHEN, F.; HU, M.; LONG, Y. SUN, H.B.; KONG, L..Y.; HONG, H.; TANG, S.S. Simvastatin Ameliorates Memory Impairment And Neurotoxicity In Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Neuroscience, maio, 2017.**

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.43 n.1, 1997.

FLEMMING, J. S. Antioxidantes: Importância dos óleos essenciais (OE) e Compostos fenólicos. **Engormix**, 2011.

FRATODDI, I.; RAPA, M.; TESTA, G.; VENDITTI, I.; SCARAMUZZO, F.A.; VINCI, G. Response surface methodology for the optimization of phenolic compounds extraction from extra virgin olive oil with functionalized gold nanoparticles. **Microchemical Journal**, Vol.138, 430–437, 2018.

GINDRI, A. L. et al. Potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das folhas de tabernaemontana catharinensis a. dc. **Revista Contexto & Saúde**. p. 1213–1216, 2011.

GODINHO, M.S.; PEREIRA, R.O.; KEYSI, O.R.; SCHIMIDT, F., OLIVEIRA, A.E. Classificação De Refrigerantes Através De Análise De Imagens E Análise De Componentes Principais (Pca). **Quimica Nova**, Vol. 31, No. 6, 1485-1489, 2008.

GOMES, R.C.; NETO, A.C.; MELO, V.L.; FERNANDES, V.C.; DAGRAVA, G.; SANTOS, W.S.; PEREIRA, P.S; COUTO, L.B.; BELEONI, R.O. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Tabernaemontana catharinensis. **Pharmaceutical Biology**, 2009.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, 1170-1179, 2008.

JAQUES, J.A.; BECKER, L.; SOUZA, C.C.G.; LEAL, C.; BERTOLDO, T.M.; PINHEIRO, K.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C.; LEAL, D.B.R. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochemistry and Function** 31:395-399, 2013.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FÜRST, P.; BIESALSKI, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids**. Free Radical Biology and Medicine** 20:251-256, 1996.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 2017.

KAKKAR, R.; KALRA, J.; PRASAD, S.M.K. Lipid peroxidation and activity of antioxidante enzymes in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v.151, p.113-119, 1995.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of Cynara cardunculus extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861-868, 2008.

LADDHA, N.C.; DWIVEDI, M.; MANSURI, M.S.; GANI, A.R.; ANSARULLAH, M.; RAMACHANDRAN, A.V.; DALAI, S.; BEGUM, R. Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. **Experimental Dermatology** 22:245–250, 2013.

LEE, J.N.; DUTTA, R.K.; MAHARJAN, Y.; LIU, Z.Q.; LIM, J.Y.; KIM, S.J.; CHO, D.H.; SO, H.S.; CHOE, S.K.; PARK, R. Catalase inhibition induces pexophagy through ROS accumulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** p.501, v.696-702, 2018.

LEHRKE, M.; MARX, N. Diabetes Mellitus And Heart Failure. **The American Journal of Medicine**. 2017.

LEHMANN, A.C.; PAULETI, N.N.; RODRIGUES, A.F.; ALBERTON, M.D.; VEIGA, B.V.; ZIMATH, P.L.; LIMA, D.D.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; MAGRO, D.D.D; BARAUNA, S.C.; Effects of Tabernaemontana catharinensis ethyl acetate fraction on glycemic responses and oxidative stress. **Nutrire.** v. 40 p.297-305, 2015.

MARINHO, F.F.; SIMÕES, A.O.; BARCELLOS, T.; MOURA, S. Brazilian Tabernaemontana genus: Indole alkaloids and phytochemical activities. **Fitoterapia**, p. 127 – 137, 2016.

MESSIAS, Karina Luiza da silva. Dossiê AntioxidDantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 6, p. 16–31, 2009.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry** 247:3170–3175, 1972.

MOLYNEUX, P. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. Songklanakarin. **Journal of Science and Technology**, v. 26, n. December 2003, p. 211–219, 2004.

MORAES, I.B. **Alterações Histopatológicas e estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com extrato aquoso de Vochysia rufa**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MOREIRA, A.V.B; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on Lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Rev. Nutr., Campinas**, v.17 p 411-424, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. **Journal of Chromatography**, 1054, 95-111, 2004.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 41, n. 2, abr./jun., 2005.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Entalpy of the composition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. **Analytical Biochemistry** 49:474-479, 1972.

NICOLA, C. **Estudo Fitoquímico e Avaliação Das Atividades Antioxidante E Anticolinesterásica De Tabernaemontana Catharinensis**. Dissertação de Mestrado - Universidade de Caxias do Sul, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.

NUNES, M.E.M.; MÜLLER, T.E.; MURUSSI, C.; AMARAL, A.M.B.; GOMES, J.L.C.; MARINS, A.T.; LEITEMPERGER, J.; RODRIGUES, C.C.R.; FIUZA, T.L.;

COSTA,M.D.; SEVERO, E.S.; ROSEMBERG, D.B.; LORO, V.L. Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish – A comparative study**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. p.** 48–53, 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** 95:351-358, 1979.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C., ANDOLFATTO, S., KARLING, M., CALEGARI, M. A.,SADO, R. Y., MAIA, F. M. C.; ALENCAR, S. M.; LIMA, V. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26, 2054 e 2062, 2015.

OLIVEIRA, A.C.D.O.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

PEREIRA, C.G.; ROSA, P.T.V; MEIRELES, M.A. Extraction And Isolation Of Indole Alkaloids From Tabernaemontana Catharinensis A.DC: Technical And Economical Analysis. **The Journal. of Supercritical Fluids**. Junho, 2006.

PIANA, M.; BOLIGON, A.A.; BRUM, T.F.; ZADRA, M. BELKE, B.V.; FROEDER, A.L.F.; FROHLICH, J.K.; NUNES, L.T.; PAPPIS, L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M. Phytochemical analysis and antioxidant capacity of Tabernaemontana catharinensis A. DC. Fruits and branches. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, p. 881-888, 2014.

PRADO, E. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. [s.l.] **Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz**", 2009.

RAMALHO, C.V.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **QuímicaNova** v.29 no.4, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. EVANS-RICE, C. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REITZER, F.; ALLAIS, M.; BALL, V.; MEYER, F.; Polyphenols at interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science. v.**257, p.31–41, 2018.

RENARD, C.M.G.C. Interactions Between Dietary Antioxidants and Plant Cell Walls. **Reference Module in Food Science.** p.1-11, 2018.`

RONGRNG, Z.; HU, A.; YUAN, J.; WU, D. Effects of Puerariae radix extract on the increasing intestinal permeability in rat with alcohol-induced liver injury. **Journal of Ethnopharmacology.** V. 126, p. 207-214, 2009.

ROTIMI, S.O.; ROTIMI, O.A.; ADELANI, I.B.; ONUZULU, C.; OBI, P.; OKUNGBAYE, R. Stevioside modulates oxidative damage in the liver and kidney of high fat/low streptozocin diabetic rats. **Heliyon** v.4, 2018.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pelo Método De Redução Do Ferro (FRAP). Comunicado Técnico 125, **Embrapa** - Fortaleza, CE, 2006.

SILVA, M.; LIMA, W.G.; SILVA, W.E.; PEDROSA, M.L. Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2011.

SILVA, A.G.; Lima, R.A.; Silva, L.P.D.S.; RAMOS, A.C.. Uso, Conservação E Diversidade De Plantas Aromáticas, Condimentares E Medicinais Para Fins

Medicinais Na Comunidade Vila Princesa, Porto Velho-RO. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 2, p. 21-35, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–179, 1999.

RODRIGUES. S.L.; MARTINS, L.V.; BANTIM, F.CI.; MEIRELES, D.M.S.; FERREIRA, P.M.P.; PERON, A.P. Flavonoids: Chemical composition, medical actions and toxicity. **Acta toxicol. argent.** vol.23 no.1, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–179, 1999.

SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. Â. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from Tabernaemontana catharinensis. **Parasitology International**, 135–139, 2007.

SOARES, S.E. Phenolic acids as antioxidants**. Rev. Nutr**., v.15, p.71-81, 2002.

SOUZA DE SÁ, P.G.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; FILHO, J.A.S.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A., ALMEIDA, J.R.G.S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Vol. 33, 561-566, 2012.

SOUZA-SARTORI, J. A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; AGUIAR, C. L. Parameters Of Influence On Extraction Of Phenolic Compounds From Sugarcane Tops With Total Antioxidant Activity. **Biosci. J.** Vol. 29, n. 2, 297-307, 2013.

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M.; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (Vaccinium ashei) e

sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. p.187-191, 2009.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A.R.; MENON, V.P. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. **J Clin Biochem Nutr.** V.40, p.92–100, 2007.

TEIXEIRA, FELIPE DE A.; SILVA, CARMELIRA G. DA. DPPH. Química Nova Interativa. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6OUaLje9uzD1r0zo9HWlFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q> Acesso em: 26 julho 2018.

TUPEC, M.; HÝSKOVÁ, V.; BĚLONOŽNÍKOVÁ, K.; HRANÍČEK, J.; ČERVENÝ, H.R. Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. **Food Bioscience**, agosto, 2017.

ZENG, W.C.; SUN, Q.; ZHANG, W.H.; LIAO, X.P.; SHI, B. Antioxidant activity in vivo and biological safety evaluation of a novel antioxidant peptide from bovine hairhydrolysates. **Process Biochemistry**, fevereiro, 2017.

Wan, X.L.; Zheng, N.X.C.; Huang, Q., Su, W.P.; Zhang, J.F.; Zhang, L.L.; Wang, T. Antioxidant capacities of Artemisia annua L. leaves andenzymatically treated Artemisia annua L. in vitro and inbroilers. **Animal Feed Science and Technology**, Vol. 221, 27–34, 2016.

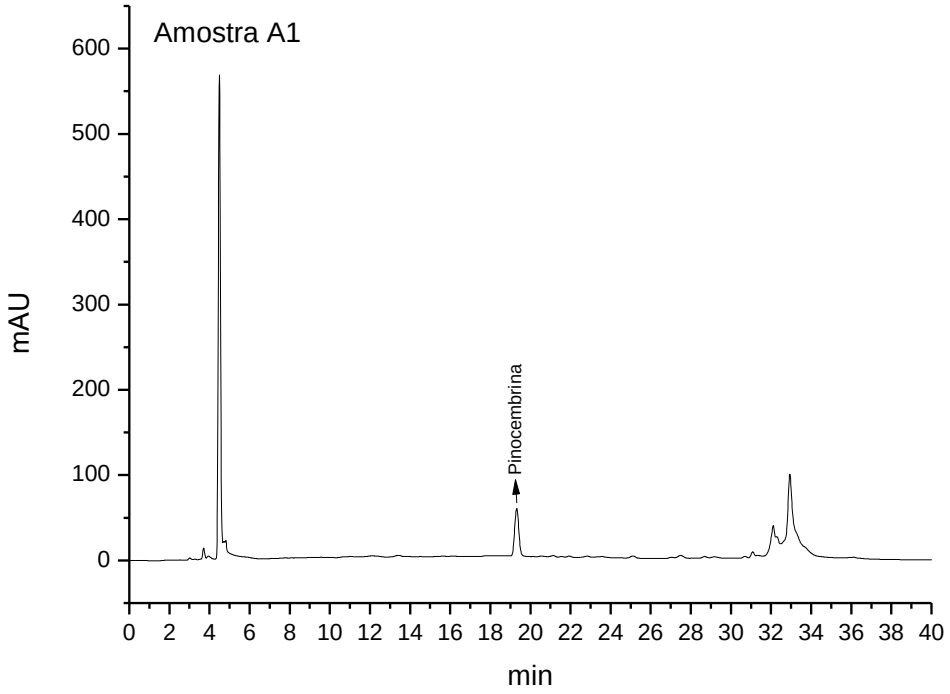
WANG, T.Y.; LI, Q.; BI, K.S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian journal of pharmaceutical,** v.13, p.12–23, 2018.

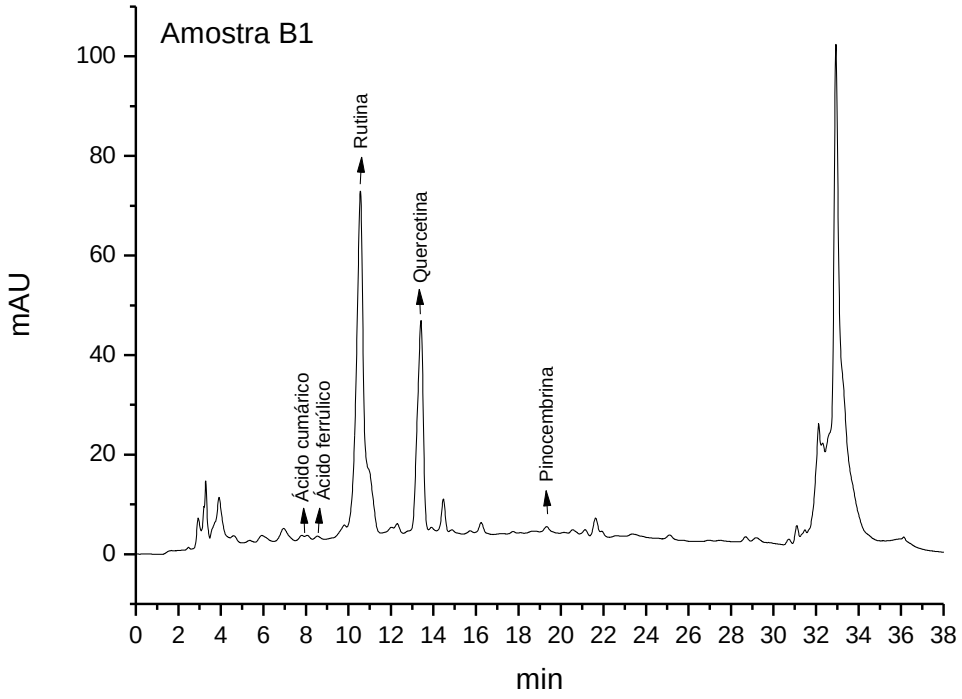
YENKOYAN, K.; HARUTYUNYAN, H.; HARUTYUNYAN, A. A certain role of SOD/CAT imbalance in pathogenesis of autism spectrum disorders. **Free Radical Biology and Medicine**. V.123, p. 85–95, 2018.

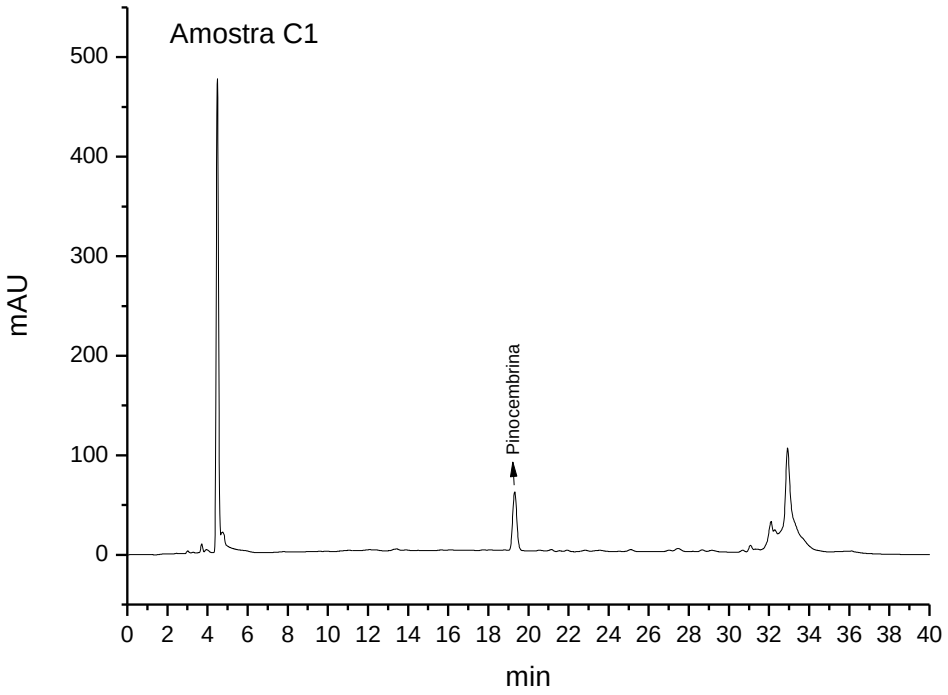
YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos E Fitoterápicos: A Necessidade Do Desenvolvimento Da Indústria De Fitoterápicos E Fitofármacos No Brasil. **Química Nova**, Vol. 24, No. 1, 147-152, 2001.

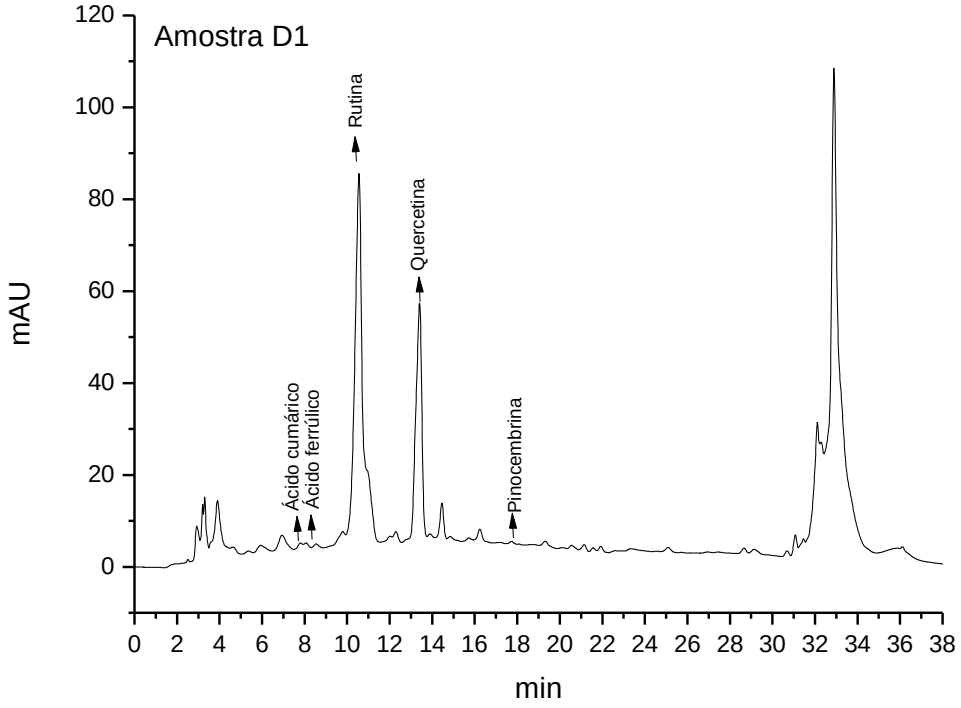
14 ANEXOS

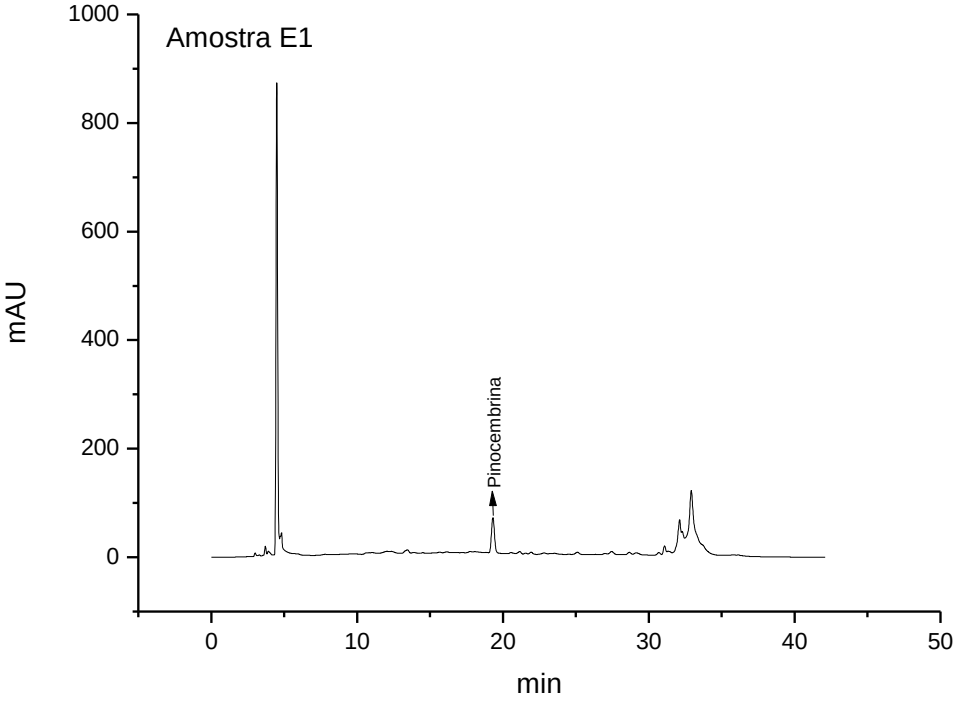
Figura 32- Cromatogramas dos extratos das folhas de *T. catharinensis*.

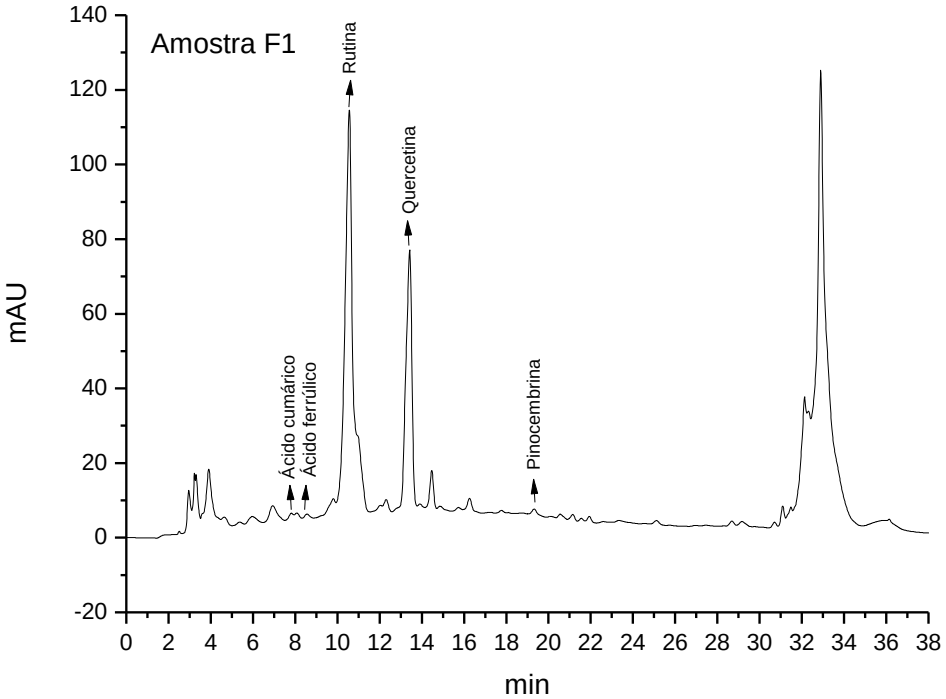


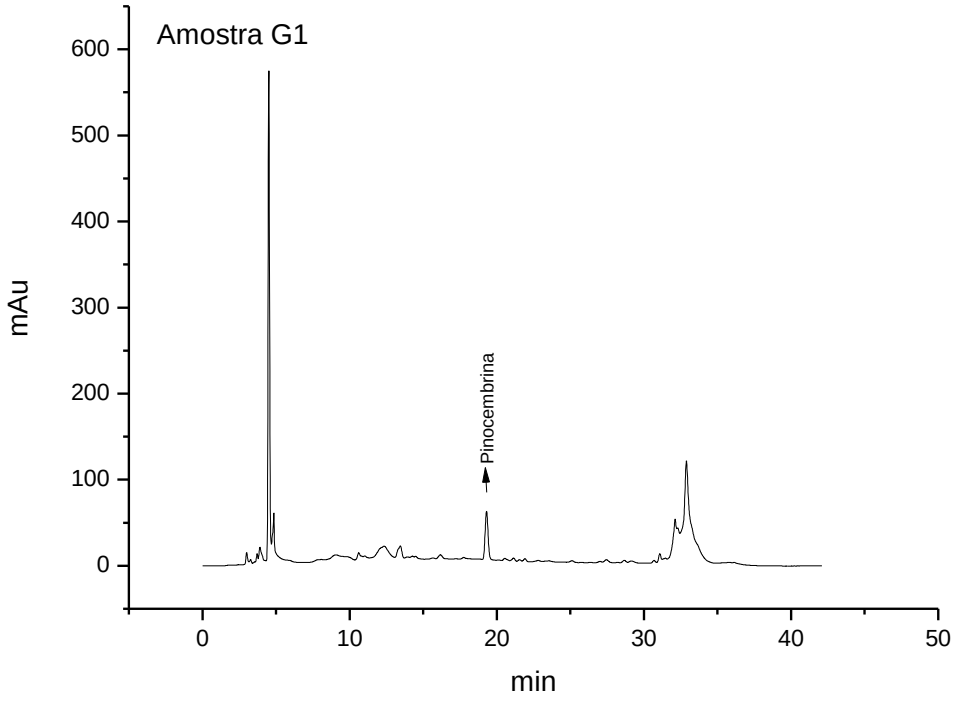


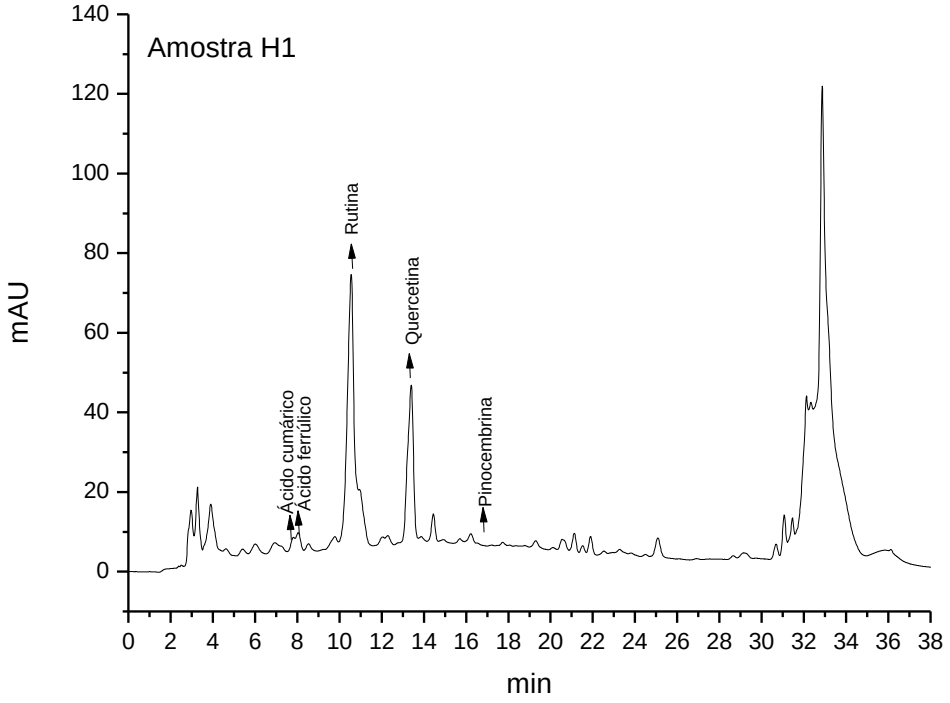

Amostra C1
mAU
min
Pinocembrina


Amostra D1
mAU
min
Ácido cumárico
Ácido ferrúlico
Rutina
Quercetina
Pinocembrina


Amostra E1
mAU
min
Pinocembrina
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50


Amostra F1
mAU
min
Rutina
Quercetina
Ácido cumárico
Ácido ferrúlico
Pinocembrina
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38


Amostra G1
mAu
min
Pinocembrina
0
100
200
300
400
500
600
0
10
20
30
40
50


Amostra H1
mAU
min
Ácido cumárico
Ácido ferrúlico
Rutina
Quercetina
Pinocembrina
0
20
40
60
80
100
120
140
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38