

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

RAFAEL SARI

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO  
DAS FOLHAS DE  
(*Tabernaemontana catharinensis*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO  
2016

RAFAEL SARI

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO  
DAS FOLHAS DE  
(*Tabernaemontana catharinensis*)**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Química da UTFPR, Campus Pato Branco.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Capelin Ignoato.

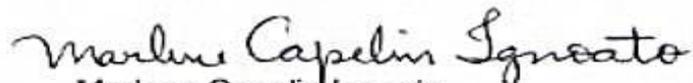
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Teresinha Carpes

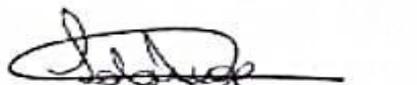
Pato Branco 2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Otimização da extração de compostos fenólicos e avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano das folhas de *Tabernaemontana catharinensis***, foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 7.2.2016-B de 2016.

Fizeram parte da banca os professores.

  
Marlene Capelin Ignoato

  
Solange Teresinha Carpes

  
Vanderlei Aparecido de Lima

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas maravilhas dadas ao homem.

Ao meu pai e minha mãe, Valdocir Pedro Sari e Beloni Mazzone Sari, por toda dedicação e carinho, no qual não mediram esforços e que por muitas vezes foram o meu amparo durante toda esta caminhada.

Aos meus irmãos, Robson Sari e Francielly Sari, agradeço pelo apoio e força durante todos estes anos.

A meus cunhados (a) Elisandra Regina Grassi Sari e Diego Carlos Perusso pela ajuda e incentivo.

As minhas orientadoras, professora Dr.<sup>a</sup> Marlene Capelin Ignoato, Dr.<sup>a</sup> Solange Teresinha Carpes, pela orientação e amizade, por terem acreditado e confiado em mim, auxiliando assim para que fosse possível a realização deste trabalho.

As mestrandas Amália Soares dos Reis, Anne Raquel Sotiles, por todo apoio e conhecimento passado, além da amizade e companheirismo.

A Guilherme Boni, Aline Grassi e Eduardo Schwaab, pela amizade e ajuda na coleta das folhas.

A Central de Análises e o laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Câmpus Pato Branco, pela disponibilidade em realizar as análises.

Enfim, agradeço também a todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, de forma especial aos participantes da sala M10, Jéssica Amorim, Gabriele Avozani, Michelli Muller, Carla Lise, Amanda Tartari, Jéssica Bordim e Otto Heinz por todo apoio, compreensão, carinho e amizade.

“...Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem ou que os seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém...”- Renato Russo.

## RESUMO

SARI Rafael. Otimização da extração de compostos fenólicos e avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano das folhas de (*Tabernaemontana catharinensis*). 2016. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

O Brasil possui grande diversidade de plantas medicinais, que o coloca em destaque na produção de biomoléculas para uso na indústria farmacêutica e de alimentos. A planta *Tabernaemontana catharinensis*, conhecida popularmente como cobrina, destaca-se devido seu amplo uso na medicina popular. O objetivo do presente trabalho foi à caracterização química e o estudo das folhas da *T. catharinensis*, através de sua atividade antioxidante e antimicrobiana. O delineamento experimental utilizado para a extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante foi um fatorial  $2^3$ , totalizando-se 8 corridas em triplicata. O efeito das variáveis independentes: solvente (etanol e acetato de etila), tempo em minutos (30 e 60 min) e temperatura em graus Celsius (35 e 65 °C) foi avaliado para se averiguar suas influências sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) em amostras de *T. catharinensis*. A melhor condição de extração ocorreu utilizando-se como solvente o etanol, tempo de 60 minutos e temperatura de 65 °C, onde obteve-se como resposta o teor de compostos fenólicos de 2,027 mg EAG/g, e atividade antioxidante DPPH de 31,959  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g. As atividades antioxidantes foram realizadas por meio da determinação do teor de compostos fenólicos, captura do radical DPPH (expresso em  $\text{IC}_{50}$  e Trolox), poder de redução do Ferro (FRAP) e ABTS, além da oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico. Pode-se observar que o extrato das folhas de *T. catharinensis* apresentaram altos valores quanto às atividades antioxidantes, o que se remete a a eficácia da extração de compostos bioativos nesta espécie. A determinação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*. O extrato das folhas de *T. catharinensis* apresentou atividade inibitória (CIM) frente à bactéria *Salmonella bongori* com uma concentração intermediária de 0,125 a 0,062  $\text{mg.mL}^{-1}$ , porém na faixa das concentrações testadas (5 a 0,005  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), não apresentou inibição frente a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os compostos fenólicos presentes no extrato das folhas de *T. catharinensis* foram identificados por meio de CLAE, sendo eles, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, rutina, catequina, ácido salicílico, ácido cumárico e miricetina e os grupos funcionais foram identificados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). Conclui-se que os resultados obtidos neste estudo confirmam as atividades antioxidantes e antimicrobianas do extrato de *T. catharinensis* podendo ser utilizada como provável fonte de compostos naturais com aplicações tanto na indústria alimentícia como na farmacêutica.

**Palavras-Chave:** Biomoléculas, Delineamento Fatorial, Plantas Medicinais.

## ABSTRACT

SARI Rafael. Optimization of the extraction of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antibacterial potential of the leaves of (*Tabernaemontana catharinensis*). 2016. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Brazil has a great diversity of medicinal plants, which places it in the spotlight in the production of biomolecules for use in the pharmaceutical and food industry. The *Tabernaemontana catharinensis* plant, popularly known as *cobrina*, stands out because of its widespread use in folk medicine. The objective of the present work was the chemical characterization and the study of the leaves of *T. catharinensis*, through its antioxidant and antimicrobial activity. The experimental design used for the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity was a factorial 2<sup>3</sup>, totaling 8 runs in triplicate. The effect of the independent variables: solvent (ethanol and ethyl acetate), time in minutes (30 and 60 min) and temperature in degrees Celsius (35 and 65 °C) was evaluated to determine their influence on phenolic compound content and activity Antioxidant (DPPH) in samples of *T. catharinensis*. The best extraction condition was the ethanol solvent, 60 minutes and 65 oC, where the phenolic content of 2,027 mg EAG / g and antioxidant activity DPPH of 31.959 µmol of Trolox / g. The antioxidant activities were carried out by determination of the phenolic compounds, DPPH (expressed in IC 50 and Trolox), iron (FRAP) and ABTS, and the coupled oxidation of beta-carotene and linoleic acid. It can be observed that the extract of the leaves of *T. catharinensis* presented high values regarding the antioxidant activities, which refers to the efficacy of the extraction of bioactive compounds in this species. The determination of the antibacterial activity was performed by means of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella bongori* microorganisms. The extract of the leaves of *T. catharinensis* showed inhibitory activity (MIC) against *Salmonella bongori* bacteria with an intermediate concentration of 0.125 to 0.062 mg.mL<sup>-1</sup>, but in the range of the tested concentrations (5 to 0.005 mg.mL<sup>-1</sup>), Showed no inhibition against *Staphylococcus aureus* bacteria. The phenolic compounds present in the extract of the leaves of *T. catharinensis* were identified by means of HPLC, being gallic acid, vanilic acid, caffeic acid, rutin, catechin, salicylic acid, coumaric acid and myricetin and the functional groups were identified by spectroscopy In the infrared region (FTIR). It is concluded that the results obtained in this study confirm the antioxidant and antimicrobial activities of *T. catharinensis* extract and can be used as a probable source of natural compounds with applications in both the food and pharmaceutical industries

**Keywords:** Biomolecules, Factorial Delineation, Medicinal Plants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Folhas de <i>Tabernaemonta catharinensis</i> .....	15
Figura 2 - Ácido fenólico (a) e Ácido tânico (b).....	16
Figura 3 - Estrutura básica de flavonóides .....	16
Figura 4 - Estrutura dos antioxidantes sintéticos mais utilizados nas indústrias. ....	17
Figura 5 - Processo oxidativo .....	18
Figura 6 - Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico e mudança de coloração.....	19
Figura 7 - Reação de oxirredução do radical ABTS .....	19
Figura 8 - Redução do complexo $Fe^{3+}$ a $Fe^{2+}$ .....	20
Figura 9 - Fluxograma das atividades realizadas.....	21
Figura 10 - Folhas de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> secas e moídas.....	29
Figura 11 - Extratos da <i>T. catharinensis</i> .....	29
Figura 12 - Gráfico de Pareto para <i>T. catharinensis</i> e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B); 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. ....	34
Figura 13 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos em função dos fatores: (A) solvente e temperatura; (B) solvente e tempo; (C) temperatura e tempo. ....	36
Figura 14 - Gráfico de Superfície referente à resposta Atividade antioxidante em função dos fatores:.....	37
Figura 15 - Microplacas de 96 poços para a análise de CIM frente os microrganismos <i>Salmonella bongori</i> (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> (B) após 24 horas de incubação. ....	39
Figura 16 - Espectro de IV-TF da amostra .....	41
Figura 17 – Cromatograma de <i>T. catharinensis</i> : 1. catequina, 2. ácido vanílico, 3. rutina 4. ácido caféico, 5. miricetina 6. ácido salicílico .....	42

**LISTA DE TABELA**

Tabela 1 - Planejamento Fatorial – níveis das variáveis independentes, tempo, temperatura de extração e tipo de solvente .....	22
Tabela 2 - Condições e Variáveis.....	22
Tabela 3 - Condições utilizadas no delineamento fatorial 2 <sup>3</sup> para a extração dos compostos bioativos da <i>Tabernaemontana catharinensis</i> .....	29
Tabela 4 - Resultados referentes ao delineamento fatorial para compostos fenólicos e DPPH determinados em <i>T. catharinensis</i> .....	30
Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes compostos fenólicos e DPPH em extratos de folhas de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> .....	32
Tabela 6 - Efeito das variáveis independentes do planejamento fatorial para as respostas dos compostos fenólicos e DPPH.....	32
Tabela 7 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores; solvente, tempo e temperatura. ....	35
Tabela 8 - Atividade Antioxidantes das folhas de <i>T. catharinensis</i> .....	38
Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico de folhas de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> .....	39
Tabela 10 - Atribuições aos picos obtidos no espectro de IV-TF. ....	41
Tabela 11 - Quantificação dos compostos fenólicos por HPLC na melhor condição de extração de <i>T.cathariensis</i> . ....	43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	12
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
3.1 <i>Tabernaemontana Catharinensis</i> : Classificação .....	13
3.2 Compostos Bioativos.....	14
3.3 Atividade Antioxidante .....	16
3.4 Métodos para Análises Dos Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante <i>In Vitro</i> .....	17
3.5 Atividade Antimicrobiana .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 MATERIAIS .....	20
4.2 MÉTODOS .....	20
4.2.1 Obtenção Da Matéria Prima .....	20
4.2.2 Tratamento Da Amostra Bruta De <i>Tabernaemontana Catharinensis</i> .....	20
4.2.3 Extração e Deliniamento Fatorial .....	21
4.2.4 Determinações De Compostos Fenólicos Totais Método Espectrofotométrico De Folin-Ciocateau.....	22
4.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS .....	23
4.2.5.1 Atividade De Sequestro Do Radical Dpph Expresso Em Ec50 .....	23
4.2.5.2 Atividades Antioxidantes Pela Oxidação Acoplada Do Beta-Caroteno E Ácido Linoleico .....	24
4.2.5.3 Atividade Antioxidante Pelo Método Abts•+ .....	24
4.2.5.4 Atividade Antioxidante Pelo Método De Redução Do Ferro – Frap ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	25
4.2.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) .....	25
4.2.7 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	26
4.2.8 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS AMOSTRAS .....	27
4.2.9 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO CLAE .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
5.1 EXTRAÇÃO.....	28
5.2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) .....	31

5.3 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES PARA A MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO.....	37
5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA .....	38
5.5 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPIA DA AMOSTRA.....	39
5.6 IDENTIFICAÇÃO/QUANTIFICAÇÃO DA AMOSTRA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	41
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma vasta biodiversidade de plantas e dentre estas algumas são consumidas e utilizadas para uso farmacológico. Porém a preocupação com a descoberta e identificação dos compostos responsáveis por esta ação farmacológica tornou-se mais notável recentemente, visto que o uso de plantas como recursos terapêuticos vem crescendo e sua utilização está descrita em toda a história da humanidade (GINDRI et al., 2011).

Os produtos naturais e as novas descobertas de compostos capazes de suprir as necessidades humanas representam uma opção viável, para soluções de problemas na saúde do nosso país. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que quase 80% da população faz uso de plantas medicinais, para sanar problemas ou ainda como alternativa básica de saúde (GINDRI et al., 2011).

O gênero *Tabernaemontana* que pertence à família Apocynaceae, apresenta-se como uma planta de grande uso na medicina popular, podendo ser encontradas em algumas regiões do Brasil, Argentina e até mesmo no Paraguai, onde popularmente é conhecida como “cobrina”, “Jasmim” e “leiteira de dois irmãos”. Dentre todas as espécies que pertencem a esta família a *Tabernaemontana catharinensis* se destaca devido seu amplo uso na medicina popular. São empregadas suas folhas, cascas e até raízes, contra desarranjos intestinais, sífilis, hanseníase ou ainda para picadas de mosquitos e dentre outras utilizações (BOLIGON et al., 2014).

*Tabernaemontana catharinensis* é descrita como uma árvore ou arbusto que possui de 3 a 10 m de altura, ramos glabros, folhas estreito-lanceoladas, base aguda e margem levemente ondulada, inflorescência geralmente com muitas flores brancas e eretas (BOLIGON et al., 2014).

Portanto considerando a busca por novas biomoléculas para a utilização na indústria farmacêutica e de alimentos e com base nas informações que a medicina e conhecimento popular nos apresenta, o presente trabalho tem como principal objetivo a caracterização química e o estudo das folhas da *Tabernaemontana catharinensis*, através de sua caracterização, atividades antioxidantes e antimicrobianas .

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo central, a otimização do extrato das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* e sua verificação quanto ao teor de fenólicos totais, atividade antioxidantes e sua ação bactericida frente aos micro-organismos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos o projeto consiste em:

- Otimizar a extração de compostos bioativos de folhas de *Tabernaemontana catharinensis*;
- Avaliar/quantificar o extrato quanto ao teor de fenólicos totais e sequestro do radical DPPH;
- Realizar as atividades antioxidantes DPPH, FRAP, ABTS, auto oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico;
- Realizar as atividades antibacterianas gram-positivas e gram-negativas frente aos micro-organismos *Staphylococcus Aureus* ATCC- 25923, *Salmonella Bongori* ATCC- 43975;
- Caracterizar o extrato utilizando infravermelho (FTIR);
- Identificar/quantificar o extrato de folhas de *Tabernaemontana catharinensis* por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Tabernaemontana catharinensis*: Classificação

Pode-se considerar como planta medicinal segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) toda a planta que apresente substâncias com propriedades terapêuticas ou que possa ter substâncias que levem a síntese de produtos químicos ou farmacêuticos. Quando se trata de Brasil, visto sua riqueza quanto a sua diversidade da vegetação, as plantas são consideradas um destaque para o país, onde possui cerca de 23% das espécies existentes em todo o planeta (LIMA; et al., 2010).

A *Tabernaemontana catharinensis* é uma espécie arbórea que possui de 3 a 10 m de altura e pertence à família Apocynaceae, cujos estudos que envolvem membros desta família afirmam que a mesma detém grandes quantidades de alcaloides. Popularmente conhecida como "jasmim", 'leiteira de Dois Irmãos' e cobra (pele de cobra), podendo ser encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai e até mesmo no Sul do Brasil (PEREIRA et al., 2004).

A utilização na medicina popular pode ser como um antídoto contra dor de dentes, onde é considerado um ótimo eliminador de verrugas. Os extratos brutos de suas sementes e folhas, cascas e raízes apresentaram uma alta atividade in vivo, já os extratos de folhas em meio alcoólico tem-se efeitos anti-inflamatórios e analgésicos quando relacionado com o teor da dose aplicada. Existem vários estudos da *Tabernaemontana catharinensis* nos quais muitos alcaloides têm sido isolados (PEREIRA et al., 2004).

*Tabernaemontana catharinensis* apresenta alcaloides, do tipo indólicos, que são substâncias que derivam do metabolismo do triptofano e se caracterizam por apresentar o núcleo indol, no qual seria um anel benzênico acoplado a um anel pirrol ou um derivado. Dentre os alcaloides indólicos, podemos classificar em cinco grupos, sendo eles alcaloides indólicos simples, pirroloindólicos, carbonílicos, indolmonoterpênicos e ergolinas (NICOLA. C, 2013).

Mesmo que alguns estudos já tenham sido realizados quanto às propriedades farmacológicas da *T. catharinensis* (Figura 1), estudos sobre os compostos bioativos desta, tem se tornado imprescindível para auxiliar no

posicionamento e na identificação de substâncias bioativas (CAPELIN-IGNOATO, 2012).



Figura 1 - Folhas de *Tabernaemonta catharinensis*

### 3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

A busca por novos antioxidantes naturais faz com que muitos estudos com plantas sejam desenvolvidos, estes estudos representam uma alternativa viável para a descoberta de novas substâncias com potenciais bioativos (NICOLA. C, 2013). Compostos bioativos podem ser utilizados na indústria alimentícia para conservação de alimentos.

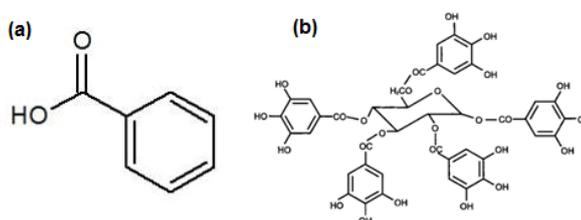
A oxidação de substâncias orgânicas contribui para a redução do tempo de vida de produtos alimentícios nas prateleiras. É de suma importância que haja a compreensão dos mecanismos de reação e as formas de combate para que a oxidação não ocorra, visto que as principais formas da reação de oxidação em produtos alimentícios são através do escurecimento enzimático e oxidação de lipídios (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Substâncias antioxidantes podem se apresentar de forma natural ou então sintética. O antioxidante sintético assume um papel para que se tenha uma diminuição da fase de propagação da reação de oxidação, mas, entretanto, apresentam grandes riscos à saúde quando estes são associados com vasto consumo. Por outro lado, os antioxidantes naturais podem ser obtidos através da extração de plantas (ANDREO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos oriundos de vegetais estão divididos em dois grupos: os não flavonóides e os flavonóides, onde ambos são classificados como metabólitos secundários, sendo que a sua distribuição nos vegetais depende de

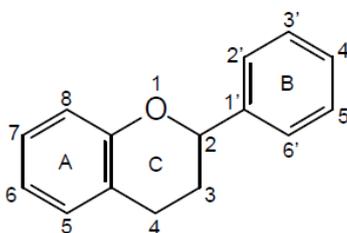
vários fatores como a ordem, família, fila, bem como a variação das espécies. Os flavonoides apresentam fins bioquímicos e farmacológicos, dentre estes, verifica-se as ações antioxidantes, anti-inflamatória, além de possuírem efeitos antialérgicos. E quando verificados em alimentos estes atuam de forma a diminuir o consumo da vitamina C, no qual, não vai haver a formação de radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os compostos fenólicos possuem como grupo funcional um grupo hidroxila ligada ao anel aromático onde variam de moléculas simples como os ácidos fenólicos (Figura 2 a), para compostos altamente polimerizados, tais como taninos (Figura 2 b) (BRAVO, 1998).



**Figura 2 - Ácido fenólico (a) e Ácido tânico (b)**  
Fonte: Bravo, (1998).

Os flavonoides, por sua vez apresentam uma estrutura química descrita como C6-C3-C6, conforme (figura 3), já os não flavonoides são descritos e classificados como: Derivados das estruturas química descrita como C6-C1 específicas dos ácidos hidroxi benzoico, gálico e elágico, os derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos caféico e p-cumárico hidroxi cinamatos e os derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do trans resveratrol, cis resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).



**Figura 3 - Estrutura básica de flavonóides**  
Fonte: Bravo, (1998)

### 3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

São definidos segundo a ANVISA, antioxidantes como substâncias que retardam ou diminuem a velocidade da oxidação em alimentos. A diminuição da

oxidação é baseada através de um ou mais mecanismos, sendo estes, a inibição de radicais livres ou a complexação de metais (EVANGELISTA, 2009).

Os antioxidantes podem ser obtidos da forma sintética ou natural, para serem posteriormente utilizados em alimentos aonde devem apresentar segurança para a saúde. São exemplos de antioxidantes sintéticos o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), propilgalato (PG) e o terc butil hidroquinona (TBHQ) (Figura 4) (MESSIAS, 2009).

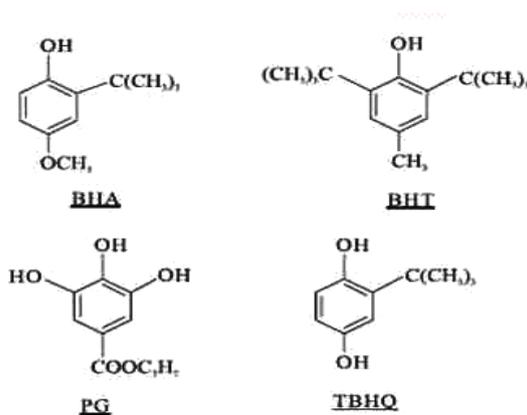
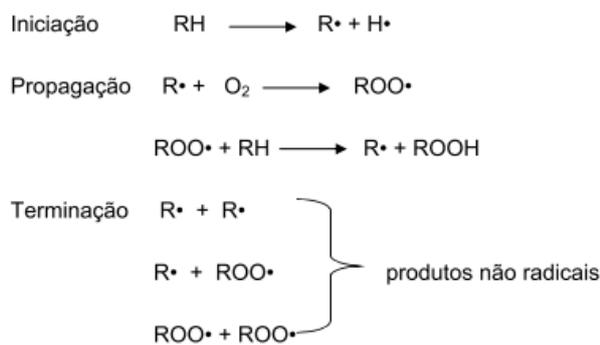


Figura 4 - Estrutura dos antioxidantes sintéticos mais utilizados nas indústrias.  
Fonte: FLEMMING (2011).

Entretanto, estudos mostram que a utilização destes antioxidantes sintéticos causam grandes efeitos que são prejudiciais à saúde, dentre estes efeitos estão os carcinogênicos. Por isso a busca incessante pelos antioxidantes naturais onde dá-se importância ao ácido ascórbico β-caroteno e vitamina E (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Dentre todos os compostos constituintes de plantas os compostos fenólicos são considerados agentes potentes antioxidativos. Estes podem agir como redutores de oxigênio singleto e sua atuação vão estar presentes em reações de oxidação lipídica, assim também como na quelação de metais. Portanto, compostos antioxidantes estão presentes em quase todos os tipos de plantas, frutas, sendo que suas concentrações mudam conforme a variação da espécie Figura 5 (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).



**Figura 5 - Processo oxidativo**

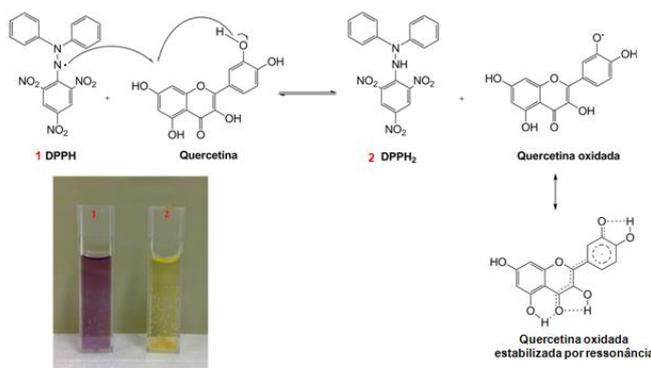
Fonte: Carpes, (2008).

### 3.4 MÉTODOS PARA ANÁLISES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas para as determinações das atividades *in vitro*, bem como estas técnicas possam permitir uma rápida seleção de substâncias com um alto valor potencial no qual visa a prevenção de doenças crônico-degenerativo. Dentre todos os métodos dá-se destaque a quantificação dos compostos fenólicos, os métodos DPPH, ABTS, FRAP e co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

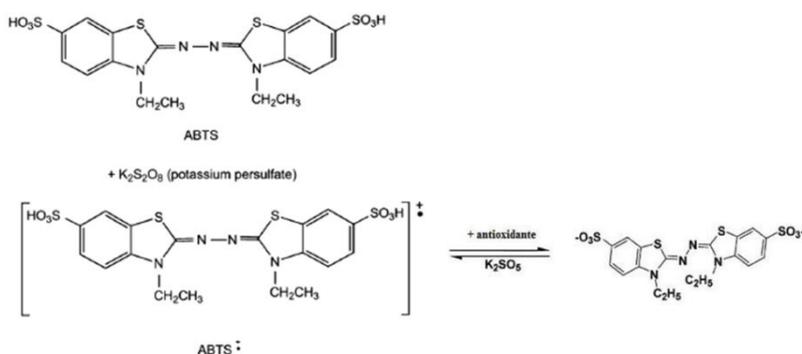
A quantificação dos compostos fenólicos totais é baseada nas reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. O método utiliza o reagente de *Folin-Ciocalteu*, que na presença de fenóis e um meio alcalino reduz o *fosfomolibdato-fosfotungstato*, a molibdênio, resultando em uma coloração azul (SILVA et al., 2010).

A molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil conhecida como DPPH é um radical nitrogênio orgânico, estável que possui coloração violeta e sua absorção máxima fica na faixa de 515-520 nm. Esta molécula se caracteriza como um radical livre estável em solução de coloração violeta forte. Quando na presença de compostos com poder de doar hidrogênio, haverá uma perda de coloração, mudando a coloração da solução reativa de violeta para amarela, conforme a Figura 6 (MOLYNEUX, 2004).



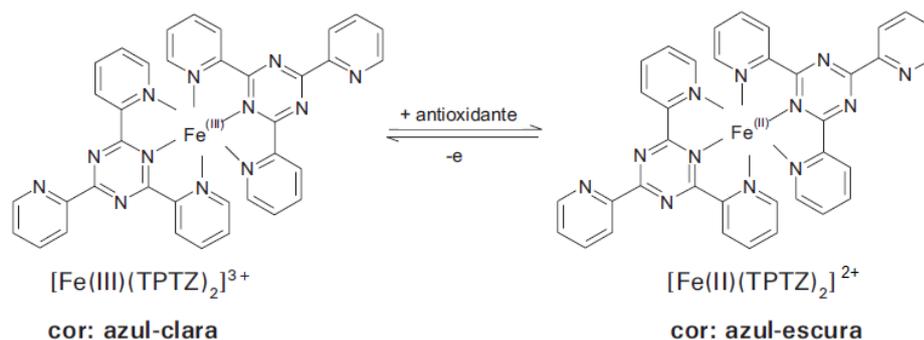
**Figura 6 - Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico e mudança de coloração....**  
Fonte: Teixeira (2013).

O método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico), constitui-se de um dos métodos espectrofotométrico que é aplicado para a medição da atividade antioxidante total de substâncias puras. Este método baseia-se na ativação de metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS para produzir um cátion radicalar. (RE et al., 1999)



**Figura 7 - Reação de oxirredução do radical ABTS**  
Fonte: Rufino (2008).

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), também é um método muito utilizado entre as análises antioxidantes por ser uma análise que envolve a redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Essa reação ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, onde ocorre a formação de um complexo corado. Assim este complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe<sup>III</sup>-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe<sup>II</sup>-TPZ) na presença de um antioxidante (RUFINO et al., 2006).



**Figura 8 - Redução do complexo Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>**

Fonte: Rufino (2008).

E por fim o método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método baseia-se na descoloração de medidas espectrofotométricas do  $\beta$ -caroteno alterada devido aos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

### 3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os compostos com atividades antimicrobianas como os extratos vegetais, óleos essenciais ou compostos isolados tais como alcaloides, flavonoides, diterpenos são fontes potenciais de compostos bioativos. Medicamentos derivados de plantas estão sendo utilizados em todo o mundo, para o tratamento de uma ampla gama de doenças, incluindo de origem infecciosa por fungos, bactérias e infecções causadas por vírus (BOLIGON et al., 2014).

Os microrganismos resistentes a agentes antibacterianos tem se tornado um grande problema mundial. Em resposta a essa resistência, a uma procura por novos compostos com propriedades antibacterianas onde se tem chamado a atenção das principais indústrias farmacêuticas, juntamente com estudos em universidades visando isolamento e identificação desses compostos (CABRAL, 2008).

Visto que muitos compostos fenólicos podem ter essa ação antimicrobiana e também podem estar relacionados à inativação das enzimas celulares e mudanças na permeabilidade das membranas celulares (BELDA-GALBIS, et al., 2015).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

O material vegetal foi coletado na cidade de Tenente Portela, Rio Grande do Sul.

#### 4.2.2 TRATAMENTO DA AMOSTRA BRUTA DE *Tabernaemontana catharinensis*.

Foram separadas somente as folhas da amostra bruta de *Tabernaemontana Catharinensis*. Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa a 35°C e triturado em moinho de facas, para que logo após fosse realizada a extração da planta via delineamento fatorial. A descrição das atividades realizadas é demonstrada pelo fluxograma Figura 7.

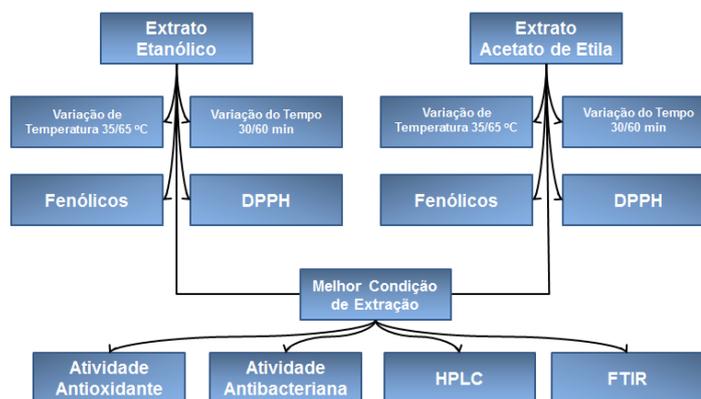


Figura 9 - Fluxograma das atividades realizadas.

#### 4.2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE *Tabernaemontana catharinensis* E DELINEAMENTO FATORIAL

Foi utilizado um delineamento fatorial  $2^3$ , totalizando-se 8 corridas em triplicada (Tabela 1), para se investigar os efeitos das variáveis solvente (etanol e

acetato de etila), tempo em minutos (30 e 60 min) e temperatura em graus Celsius (35 e 65 °C) sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. As variáveis independentes foram representadas por 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 a quantificação de compostos fenólicos e a atividade antioxidante através do método do sequestro do radical DPPH.

**Tabela 1 - Planejamento Fatorial – níveis das variáveis independentes, tempo, temperatura de extração e tipo de solvente**

Ensaio	Solvente	Tempo	Temperatura
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

**Tabela 2 - Condições e Variáveis**

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

A extração dos compostos bioativos foi realizada conforme PRADO (2009) com pequenas modificações. Os solventes escolhidos para extração foram etanol e acetato de etila. O solvente escolhido se deve principalmente pela facilidade de manipulação, a baixa toxicidade. Na qual, 3 g de folhas moídas foram transferidas para Erlenmeyers e adicionados 30 mL dos solventes separadamente e submetidos a agitação em *Shaker* (SL 222) à 120 rpm conforme o 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 sequência os extratos foram filtrados e armazenados em frascos hermeticamente

fechados, sob abrigo de luz e em freezer a - 5 °C 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 e pela atividade antioxidante pelo método DPPH expresso em mg de Trolox/g de amostra.

#### 4.2.4 DETERMINAÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE FOLIN-CIOCATEAU

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton (1999). No qual uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi transferida para tubos de ensaio sendo adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%). Após 5 minutos de repouso da mistura, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 %). As soluções foram conservadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente e após 2 horas foram realizadas leituras das absorvâncias a 740 nm. Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalente em ácido gálico.g<sup>-1</sup> de amostra (mg GAE.g<sup>-1</sup>) e calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variam de 1,25 a 62,5 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

A determinação e a avaliação das atividades antioxidantes serão desenvolvidas, por diferentes tipos de métodos, sendo eles: pelos métodos x, y e z.

##### 4.2.5.1 ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH EXPRESSO EM EC<sub>50</sub>

A atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams (1995). Para avaliação da atividade antioxidante, as amostras reagem com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. A mistura de reação é constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH (0,3 mM) em etanol. Mede-se a redução do radical DPPH por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância, em espectrofotômetro a 517 nm, em tempo inicial e a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção. Os resultados foram expressos como coeficiente de inibição ( $EC_{50}$ ), ou seja, a quantidade de amostra necessária para reduzir o radical DPPH pela metade da concentração inicial, no tempo em que atingiu a estabilidade determinada através de uma cinética de reação. A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada pela Equação (1):

$$\% \text{Atividade antioxidante} = 100 - \left\{ \frac{[(\text{Amostra} - \text{Abranco}) \times 100]}{A_{\text{controle}}} \right\} \text{Eq. 1}$$

Onde:

$A_{\text{amostra}}$ : absorbância da solução com amostra e DPPH;

$A_{\text{branco}}$ : absorbância da solução com amostra sem adição de DPPH;

$A_{\text{controle}}$ : absorbância da solução referência (DPPH e etanol).

#### 4.2.5.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES PELA OXIDAÇÃO ACOPLADA DO BETA-CAROTENO E ÁCIDO LINOLEICO

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e do ácido linoleico, de acordo com Ahn et al. (2004). Uma solução de  $\beta$ -caroteno foi preparada com 10 mg de  $\beta$ -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. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foram

misturadas com 300 µL dos extratos. 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 °C, 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 (2):

$$AA(\%) = \frac{DR_c - DR_s}{DR_c \times 100} \text{ Eq. 2}$$

Onde: AA representa a atividade antioxidante, DR<sub>c</sub> a taxa de degradação da amostra controle (ln(a/b)/120); DR<sub>s</sub> a taxa de degradação da amostra contendo a substância teste (ln(a/b)/120); o a absorbância inicial no tempo 0 e b a absorbância depois de 100 min.

#### 4.2.5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS•+

A capacidade de sequestrar o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS•+) foi determinada segundo o método descrito por Re *et al.*, 1999. O radical ABTS•+ foi 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. Após esse período, diluiu-se a solução em etanol até obter absorbância no comprimento de onda de 700 a 734 nm. As amostras foram adicionadas a solução do ABTS•+ e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 minutos de reação. Como referência utilizou-se Trolox (6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um antioxidante sintético equivalente à vitamina E, nas concentrações de 0,045 a 0,0015 µmol para a curva padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol TEAC.g-1 de amostra (TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

#### 4.2.5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO – FRAP (*FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER*)

Para a determinação da atividade antioxidante mediante a redução do ferro (FRAP), foi utilizada 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 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub> (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 foi desenvolvida com sulfato ferroso (200 a 2000 µM), e os resultados expressos em µmol Fe<sup>2+</sup>·g<sup>-1</sup> de amostra.

#### 4.2.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O método realizado será por micro diluição em placa de 96 poços de acordo com a metodologia de CLSI, 2005. Os microorganismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana serão: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Salmonella bongori* ATCC-43975. Essas bactérias foram preparadas a partir de colônias com 24 horas de incubação em meio BHI (*Brain heart infusion*).

Depois de terem sido feitas as preparações bacterianas, as mesmas foram ressuspendidas em tubos de ensaios contendo soro fisiológico esterilizado e ajustado para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro o que equivale a 1–2x10<sup>8</sup> UFC/mL na escala de *Mc Farland*, (UFC = Unidade formadora de colônias). Com a concentração já ajustada, um volume de 50µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em 50 mL de caldo BHI devidamente esterilizado.

Para iniciar o procedimento da reação nas placas de 96 poços, foram pipetados 190 µL de caldo BHI inoculado, e em seguida adicionado 10 µL dos extratos, com diversas concentrações, para então incubar em estufa a 37°C por 24 horas. Para confirmação dos testes, o caldo BHI inoculado foi adicionado na placa juntamente com etanol 80% v/v, etanol p.a. e o antibiótico clorafenicol 0,12% m/v.

Após passar às 24 horas de incubação, foram adicionados 30 µL do corante resazurina (0,01% m/v). Nos poços que houve mudança na coloração, isto é,

mudança de azul para qualquer outra cor, o resultado é negativo, ou seja, houve crescimento bacteriano já nos poços que a coloração permaneceu inalterada, o resultado é positivo, ou seja, não houve crescimento bacteriano.

#### 4.2.7 CONCENTRAÇÕES BACTERICIDAS MÍNIMAS (CBM)

A análise foi realizada com base nos resultados obtidos no teste da CIM, onde uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  provenientes dos poços onde não houve crescimento bacteriano, isto é, resultados positivos serão transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e logo após levado a estufa por 24 horas a 37°C. A CBM será considerada a menor concentração que causou 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar (CLSI, 2005).

#### 4.2.8 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS AMOSTRAS

A técnica de FTIR tem sido amplamente utilizada na identificação de vários compostos em diversas matrizes complexas. Realizou-se a caracterização espectroscópica da amostra a partir da técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), utilizando o acessório de Refletância Atenuada Universal (Universal Attenuated Total Reflectance UATR), com polarizador ajustável. As medidas foram realizadas a partir de 32 varreduras no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ , em espectrofotômetro da marca Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Frontier, o Infravermelho pertence a Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Pato Branco.

#### 4.2.9 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO CLAE

Os compostos fenólicos foram identificados a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizou-se equipamento Cromatógrafo a Líquido VARIAN-900LC, numa coluna C18.

Na otimização da metodologia para separação e identificação de compostos fenólicos por (CLAE) realizou-se as injeções de 10 µL da mistura dos padrões, onde foram utilizados como padrões caféico, gálico, ferúlico, cumárico, salicílico, siríngico e vanílico; flavonoides catequina, epicatequina, rutina e o estilbeno resveratrol. E a composição da fase móvel foi água e metanol acidificado com ácido acético, temperatura da coluna 31°C e ocorreu na forma de gradiente de polaridade.

Os Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada composto foram determinados para as diferentes curvas de calibração a partir do desvio padrão do intercepto (S) (coeficiente linear) e da média da inclinação da curva de calibração (b) (coeficiente angular), conforme as Equações 3 e 4 (RIBANI et al.,2004)

$$LD = 3 * \left(\frac{S}{b}\right) Eq. (3) \quad LQ = 10 * \left(\frac{S}{b}\right) Eq. (4)$$

O Cromatógrafo pertence a Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Pato Branco.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO

As folhas da *Tabernaemontana catharinensis* Figura 8, foram secas em estufa a 35°C e trituradas em um moinho de facas. Em seguida estas foram submetidas à extração dos compostos bioativos segundo o delineamento proposto na Tabela 3. O delineamento foi realizado a partir de oito ensaios realizados em triplicata.

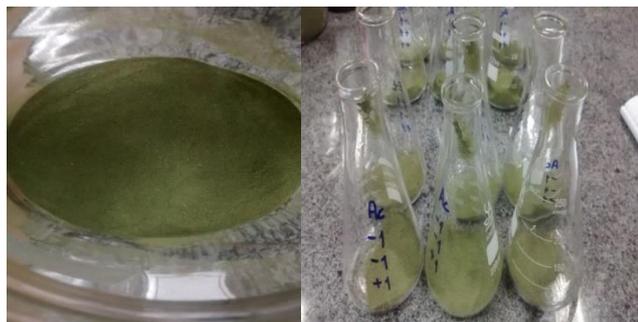


Figura 10 - Folhas de *Tabernaemontana catharinensis* secas e moídas.

Tabela 3 - Condições utilizadas no delineamento fatorial  $2^3$  para a extração dos compostos bioativos da *Tabernaemontana catharinensis*.

Ensaio	Solvente	Tempo	Temperatura
A1	Acetato de etila	30 min	35 °C
A2	Etanol	30 min	35 °C
A3	Acetato de etila	60 min	35 °C
A4	Etanol	60 min	35 °C
A5	Acetato de etila	30 min	65 °C
A6	Etanol	30 min	65 °C
A7	Acetato de etila	60 min	65 °C
A8	Etanol	60 min	65 °C

A Figura 11 é uma demonstração dos extratos da folha de *Tabernaemontana catharinensis*. Após a centrifugação os extratos obtiveram coloração esverdeada e aspecto homogêneo.

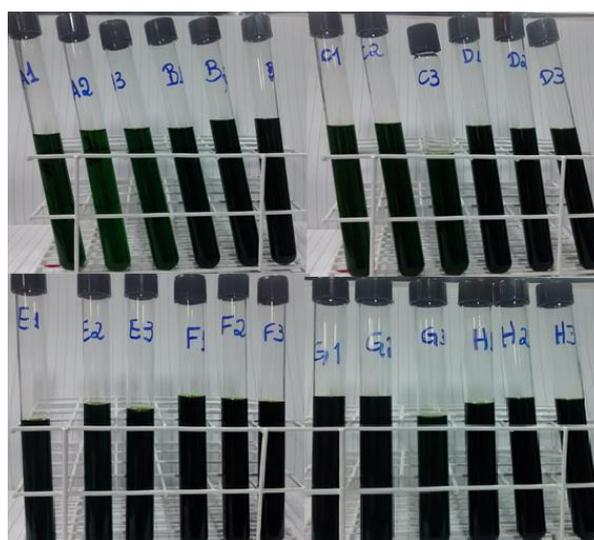


Figura 11 - Extratos da *T. catharinensis*.

O teor de compostos fenólicos totais (TCF) e atividade antioxidante (AA) nos respectivos extratos das amostras estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4 - Resultados referentes ao delineamento fatorial para compostos fenólicos e DPPH determinados em *T. catharinensis*.**

Ensaio	Variáveis			<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	
	X1	X2 (min)	X3 (°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 ± 0,797139
A2	(+1) Etanol	(-1) 30	(-1) 35	0,981 ± 0,058	26,833 ± 0,637073
A3	(-1) Acetato de Etila	(+1) 60	(-1) 35	0,670 ± 0,026	21,353 ± 0,611991
A4	(+1) Etanol	(+1) 60	(-1) 35	1,047 ± 0,036	24,800 ± 2,159221
A5	(-1) Acetato de Etila	(-1) 30	(+1) 65	0,759 ± 0,043	19,727 ± 1,200721
A6	(+1) Etanol	(-1) 30	(+1) 65	1,294 ± 0,129	27,068 ± 1,150148
A7	(-1) Acetato de Etila	(+1) 60	(+1) 65	1,070 ± 0,066	20,705 ± 0,889887
A8	(+1) Etanol	(+1) 60	(+1) 65	2,027 ± 0,312	31,959 ± 2,038619

Médias ± desvio padrão. Ensaio A1 a A8 – combinação de solventes, tempo e temperatura; X1, variável solvente, (-1) Acetato de etila (+1) Etanol; X2: variável tempo (min), (-1) 30 min (+1) 60 min; X3: variável temperatura (°C), (-1) 35°C (+1) 65°C; TCF: Teor de compostos fenólicos totais; AA: Atividade antioxidante pelo método sequestro do radical DPPH; EAG: equivalente em ácido gálico., n = 3.

A média total do teor de compostos fenólicos (TCF) nos extratos de *T. catharinensis* variou de 0,561 a 2,027 mg de EAG/g (EAG: Equivalente em ácido gálico) de amostra e atividade antioxidante (AA) de 18,584 a 31,959 µmol de Trolox/g de amostra. O menor teor de TCF foi encontrado no ensaio A1 (Acetato de Etila, 35°C, 30 min) já o maior teor de TCF nas amostras de *T. catharinensis* foi encontrado no ensaio A8, o mesmo ocorreu com a Atividade antioxidante pelo método sequestro do radical DPPH (AA), conforme pode ser observado pela Tabela 4.

Avaliando os ensaios, é possível observar que os ensaios, utilizando o etanol, e um tempo de 60 minutos de extração e 65 °C apresentou os melhores resultados. Estudos já realizados indicaram que os compostos fenólicos são muito mais solúveis em solventes orgânicos menos polares do que a água. E que para o material vegetal tenha uma extração eficaz, este vai depender de uma escolha apropriada do solvente, altas temperaturas e agitação mecânica, para que se maximize a obtenção dos compostos fenólicos (MATTOS, 2013).

Segundo (MELO, 2012) estudando o extrato etanólico de *Tabernaemontana solanifolia* obtiveram como resposta para os teores de compostos fenólicos 86,86 mg/g, os resultados obtidos neste estudo foram inferiores ao encontrado pelo autor, porém se torna difícil a comparação, pois as condições de extração foram bem diferentes quando comparadas com este trabalho. Bem como a determinação dos

compostos é feita pelo método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu e uma das suas limitações é por se tratar do fato de que alguns compostos mesmo não sendo fenólicos podem reagir e assim nos forneceria teores de compostos superestimados (MELO, 2012).

Já a atividade antioxidante do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* difere ao do observado por Nicola (2013), onde o teor de atividade antioxidante varia de 37,18 a 249,61  $\mu\text{g/mL}$ . Istopode ter ocorrido devido ao fato de que a extração ocorreu de maneira diferente das realizadas neste estudo.

## 5.2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

**Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes compostos fenólicos e DPPH em extratos de folhas de *Tabernaemontana catharinensis*.**

Fatores	Planta: <i>T. catharinensis</i> Variável dependente: Compostos fenólicos					Planta: <i>T. catharinensis</i> Variável dependente: DPPH				
	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F-calculado	p-valor	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F-calculado	p-valor
Solvente (X1)	<b>1,961617</b>	<b>1</b>	<b>1,961617</b>	<b>97,14499</b>	<b>0,000000</b>	<b>287,0970</b>	<b>1</b>	<b>287,0970</b>	<b>62,50200</b>	<b>0,000000</b>
Temperatura (X2)	<b>1,341144</b>	<b>1</b>	<b>1,341144</b>	<b>66,41738</b>	<b>0,000000</b>	<b>41,4383</b>	<b>1</b>	<b>41,4383</b>	<b>9,02126</b>	<b>0,007994</b>
Tempo (X3)	<b>0,556078</b>	<b>1</b>	<b>0,556078</b>	<b>27,53860</b>	<b>0,000065</b>	5,9481	<b>1</b>	5,9481	1,29492	0,270927
X1;X2	<b>0,181935</b>	<b>1</b>	<b>0,181935</b>	<b>9,00993</b>	<b>0,008026</b>	<b>33,9959</b>	<b>1</b>	<b>33,9959</b>	<b>7,40103</b>	<b>0,014539</b>
X1;X3	0,054017	<b>1</b>	0,054017	2,67508	0,120309	4,6218	<b>1</b>	4,6218	1,00618	0,329885
X2;X3	<b>0,282491</b>	<b>1</b>	<b>0,282491</b>	<b>13,98976</b>	<b>0,001629</b>	<b>22,5506</b>	<b>1</b>	<b>22,5506</b>	<b>4,90934</b>	<b>0,040648</b>
Resíduo	0,343275	17	0,020193			78,0879	17	4,5934		
Total	4,720557	23				473,7396	23			

G.L. = Graus de liberdade; Resultados em negrito referem-se às diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ );**Tabela 6 - Efeito das variáveis independentes do planejamento fatorial para as respostas dos compostos fenólicos e DPPH.**

Fatores	Planta: <i>Tabernaemontana catharinensis</i> Variável dependente: Compostos fenólicos						Planta: <i>Tabernaemontana catharinensis</i> Variável dependente: DPPH					
	Efeito	Desvio Padrão	t(17)	p-valor	Coeficientes	Erro Padrão	Efeito	Desvio Padrão	t(17)	p-valor	Coeficientes	Erro Padrão
Média	<b>1,051067</b>	<b>0,029006</b>	<b>36,23589</b>	<b>0,000000</b>	<b>1,051067</b>	<b>0,029006</b>	<b>23,55083</b>	<b>0,437484</b>	<b>53,83250</b>	<b>0,000000</b>	<b>23,55083</b>	<b>0,437484</b>
Solvente (X1)	<b>0,571783</b>	<b>0,058012</b>	<b>9,85622</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,285892</b>	<b>0,029006</b>	<b>6,91733</b>	<b>0,874967</b>	<b>7,90582</b>	<b>0,000000</b>	<b>3,45867</b>	<b>0,437484</b>
Temperatura (X2)	<b>0,472783</b>	<b>0,058012</b>	<b>8,14969</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,236392</b>	<b>0,029006</b>	<b>2,62800</b>	<b>0,874967</b>	<b>3,00354</b>	<b>0,007994</b>	<b>1,31400</b>	<b>0,437484</b>
Tempo (X3)	<b>0,304433</b>	<b>0,058012</b>	<b>5,24772</b>	<b>0,000065</b>	<b>0,152217</b>	<b>0,029006</b>	<b>0,99567</b>	<b>0,874967</b>	<b>1,13795</b>	<b>0,270927</b>	<b>0,49783</b>	<b>0,437484</b>
X1;X2	<b>0,174133</b>	<b>0,058012</b>	<b>3,00165</b>	<b>0,008026</b>	<b>0,087067</b>	<b>0,029006</b>	<b>2,38033</b>	<b>0,874967</b>	<b>2,72048</b>	<b>0,014539</b>	<b>1,19017</b>	<b>0,437484</b>
X1;X3	0,094883	0,058012	1,63557	0,120309	0,047442	0,029006	-0,87767	0,874967	-1,00309	0,329885	-0,43883	0,437484
X2;X3	<b>0,216983</b>	<b>0,058012</b>	<b>3,74029</b>	<b>0,001629</b>	<b>0,108492</b>	<b>0,029006</b>	<b>1,93867</b>	<b>0,874967</b>	<b>2,21570</b>	<b>0,040648</b>	<b>0,96933</b>	<b>0,437484</b>

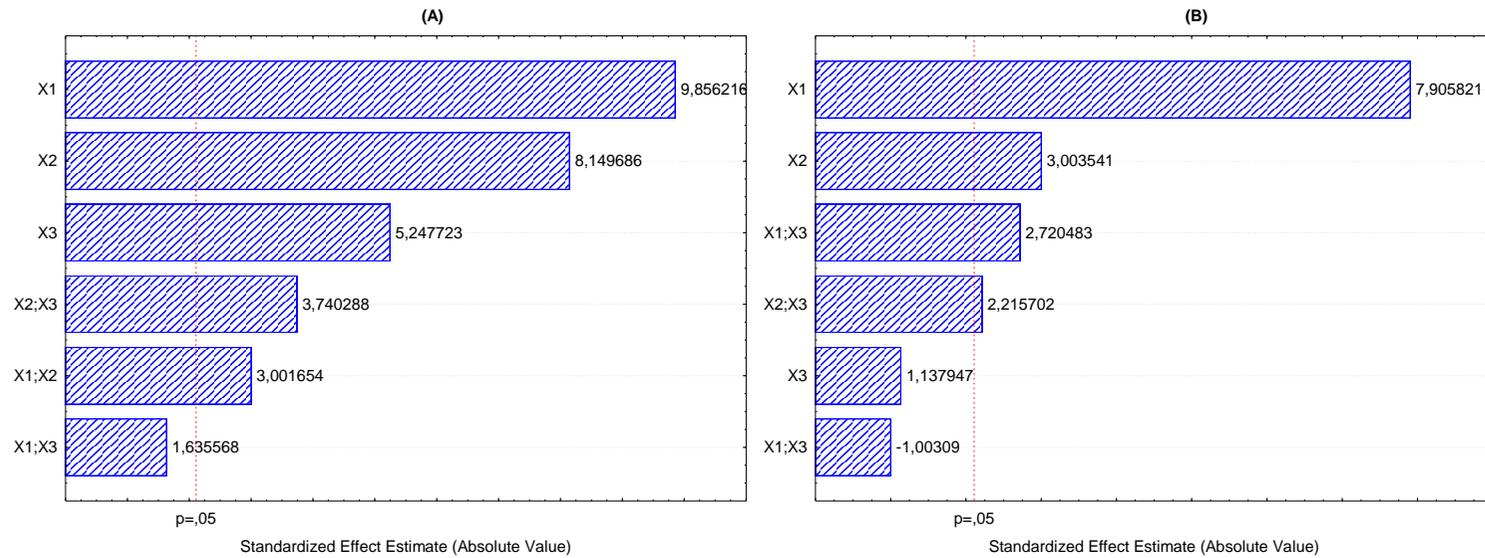
A análise da superfície de resposta foi realizada sobre os dados do delineamento fatorial  $2^3$ , tendo como fatores, tipo de solvente, tempo e temperatura de extração. Os efeitos de cada variável independente foram analisados pelo teste  $t$  e por análise de variância (ANOVA). A Tabela 5 mostra a análise de variância (ANOVA) utilizada para validação estatística e verificação do modelo, onde através desta é possível verificar que a grande maioria dos casos os efeitos dos fatores sobre as variáveis dependentes foram significativos.

Os fatores tipo de solvente, temperatura e tempo de extração foram significativos para a resposta Compostos fenólicos, assim como as interações tipo de solvente com a temperatura e entre a temperatura e tempo.

A partir da probabilidade de significância (p-valor) Tabela 6, é possível verificar, que todos os valores de cada efeito acima explicitado menores que 0,05, mostrando que são significativos.

Já o teste F também pode ser utilizado para a verificação da significância dos efeitos dos fatores sobre as respostas. A menor razão encontrada na análise de variância para os compostos fenólicos foi de 9,0099 já para a atividade antioxidante DPPH foi de 4,90934. Estes resultados mostram que os dados foram adequadamente ajustados aos modelos lineares, pois o  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ .

Os efeitos de cada variável independente foram calculados pela análise de variância e exemplificados pelo gráfico de Pareto, conforme pode ser observado pela Figura 12.



**Figura 12 - Gráfico de Pareto para *T. catharinensis* e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B); X1: Solvente; X2: tempo; X3: temperatura. X<sub>1</sub>;X<sub>2</sub>;X<sub>3</sub>: interação entre as variáveis. A linha em vermelho destaca o nível de corte para a significância.**

Através do gráfico de Pareto conclui-se que os efeitos significativos para *T. catharinensis* em relação aos teores de compostos fenólicos tiveram um efeito positivo e significativo nas variáveis solvente, temperatura, tempo e na interação temperatura e tempo, solvente e temperatura.

Já os efeitos significativos em relação à atividade antioxidante foram positivos para o tipo de solvente, temperatura e para as interações solvente e tempo, e temperatura e tempo. E ao passo que para a variável tempo, esta apresentou um efeito negativo sobre a atividade antioxidante.

**Tabela 7 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores; solvente, tempo e temperatura.**

Equação	Modelo Gerado	Coefficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
5	$TCCF = 1,051067 + 0,285892 + 0,236392 + 0,152217 + 0,087067X_1X_2 + 0,108492X_2X_3$	0,92728
6	$TCDPPH = 23,55083 + 3,45867 + 1,31400 + 1,19017X_1X_2 + 0,96933X_2X_3$	0,83517

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

Neste trabalho foi possível observar os altos coeficientes de correlação dos modelos lineares, o que indica um bom ajuste dos dados aos modelos propostos. Os coeficientes de variação se apresentaram na faixa entre de 0,83517 e 0,92728, o que denota que 83% a 92% das variações dos dados podem ser explicadas pelos modelos em cada caso analisado. O modelo de regressão linear múltipla pode gerar superfícies de resposta. As superfícies de resposta das variáveis repostas DPPH, teores de compostos fenólicos totais, em função dos fatores tempo, temperatura e tipo de solvente podem ser vistos nas Figuras 13 e 14.

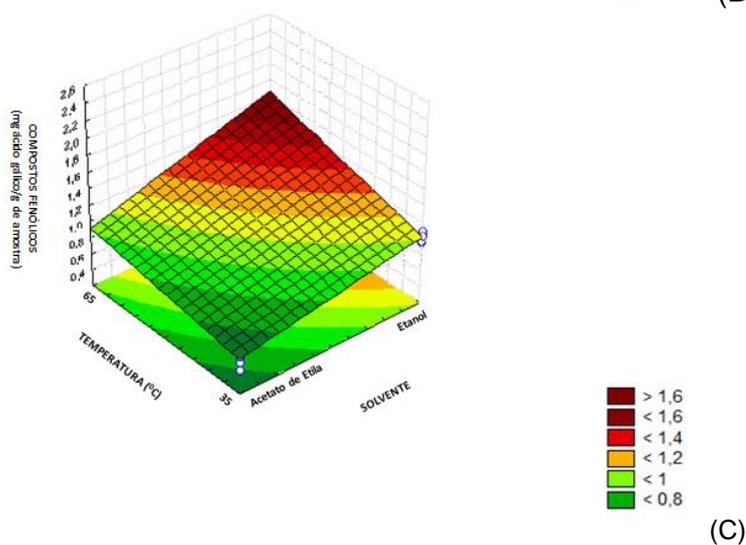
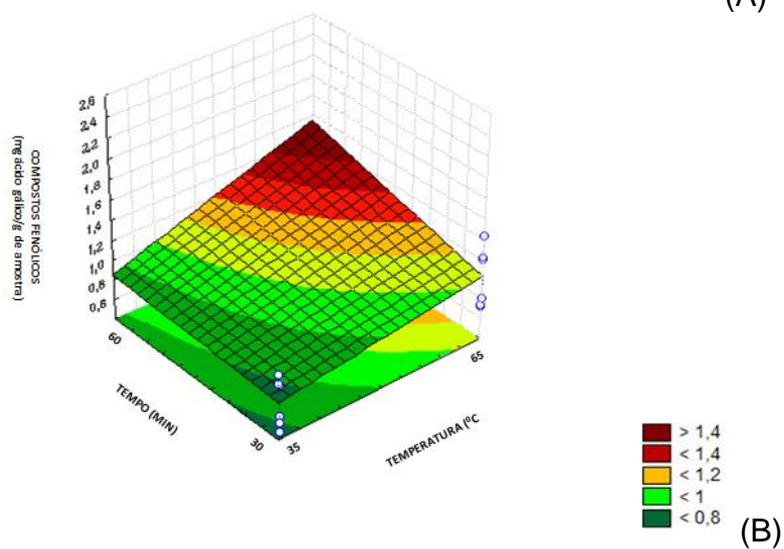
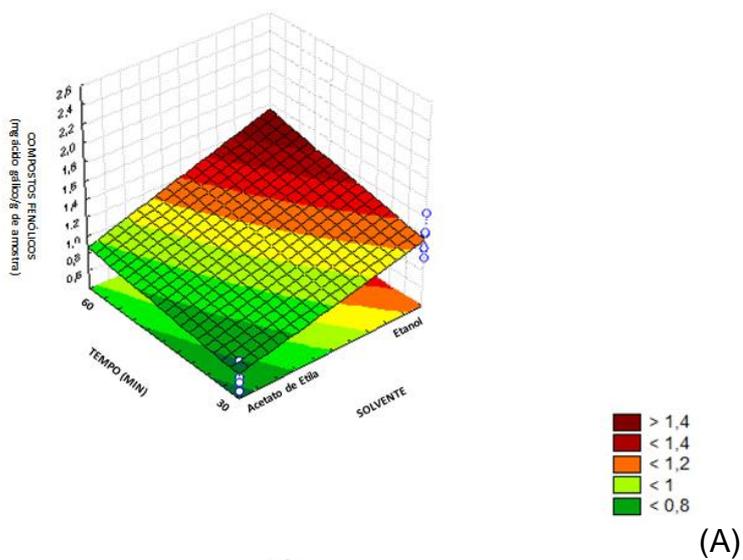


Figura 13 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos em função dos fatores: (A) solvente e temperatura; (B) solvente e tempo; (C) temperatura e tempo.

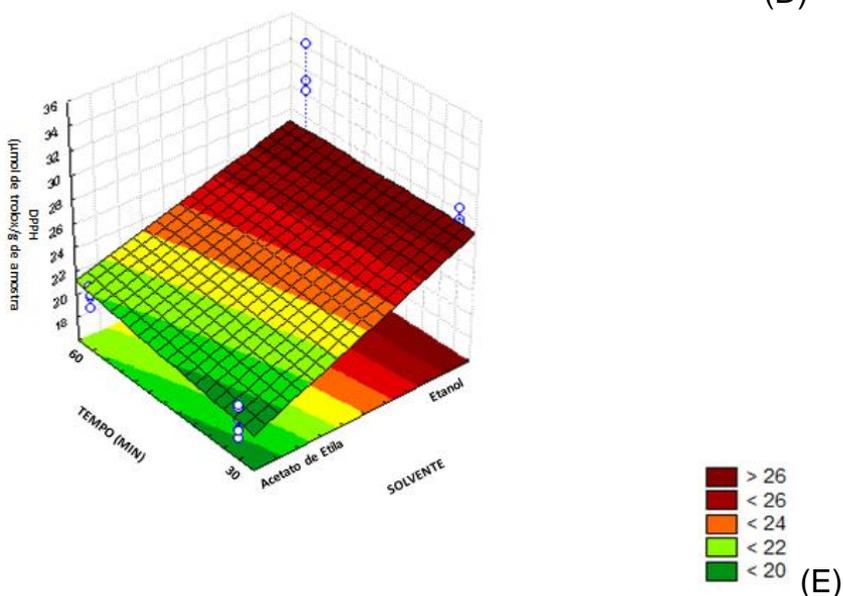
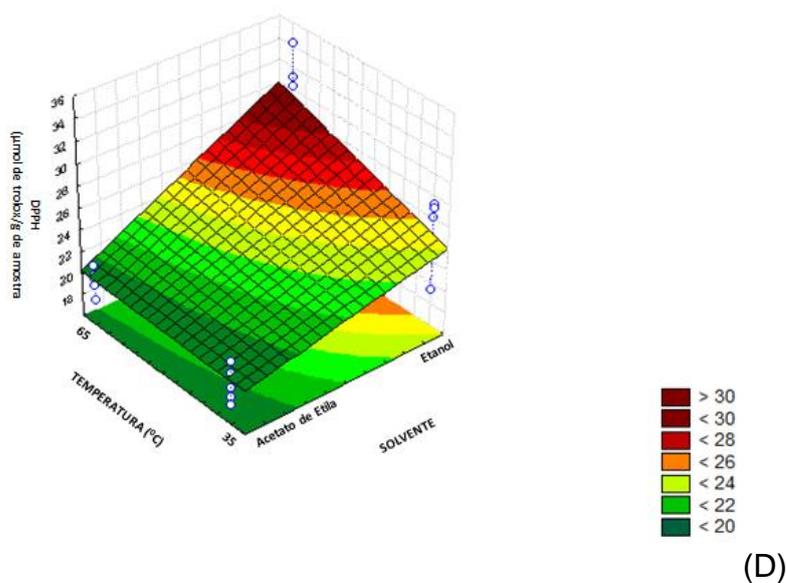


Figura 14 - Gráfico de Superfície referente à resposta Atividade antioxidante em função dos fatores: (D) solvente e temperatura; (E) solvente e tempo.

Observando as superfícies de resposta para o extrato das folhas de *T. catharinensis* Figura 13 e 14, percebe-se um aumento dos teores de compostos fenólicos quando foi utilizado o tempo de extração de 60 minutos, temperatura de 60°C e utilizando-se etanol como solvente extrator conforme as Figuras 13A, 13B, 13C. Constatou-se também que os melhores níveis para a atividade antioxidante pelo método DPPH foram determinados nas seguintes condições: temperatura de 60 °C, tempo de extração de 60 minutos e utilizando-se etanol com solvente extrator conforme as Figuras 14D, 14E.

### 5.3 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES PARA A MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO

As atividades antioxidantes do extrato etanólico de folhas de *T. catharinensis*, estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8 - Atividade Antioxidantes das folhas de *T. catharinensis***

<b>Atividades Antioxidantes</b>	<b><i>Tabernaemontana catharinensis</i></b>
Compostos Fenólicos	23,34 mg de EAG/g <sup>-1</sup>
DPPH	34,26 µmol de Trolox
FRAP	24,13 umol Fe <sup>2+</sup>
ABTS	12,57 umol Trolox
β-Caroteno	78,85 AA (%)

Segundo SHEN et al. (2016) estudando cevada preta encontrou valores inferiores quanto aos compostos fenólicos quando comparado com os valores encontrados neste estudo. Já para MELO (2012) estudando o extrato etanólico de *Tabernaemontana solanifolia* a atividade antioxidante DPPH apresentou um resultado superior ao encontrado neste estudo. MELO (2012) descreve também sobre a atividade β-caroteno, na qual os resultados encontrados em seu estudo foram superiores ao encontrado neste trabalho. As atividades FRAP e ABTS determinadas neste estudo foram inferiores ao encontrado por ROCKENBACH (2008), que utilizou extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*). Porém é difícil fazer uma comparação direta entre esses outros estudos, pois os métodos de extração se diferem de autor para autor. Mas de qualquer forma os extratos de folhas de *T. catharinensis* apresentou valores satisfatórios quanto aos teores de compostos antioxidantes, o que confirma sua alta disponibilidade de compostos bioativos.

#### 5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

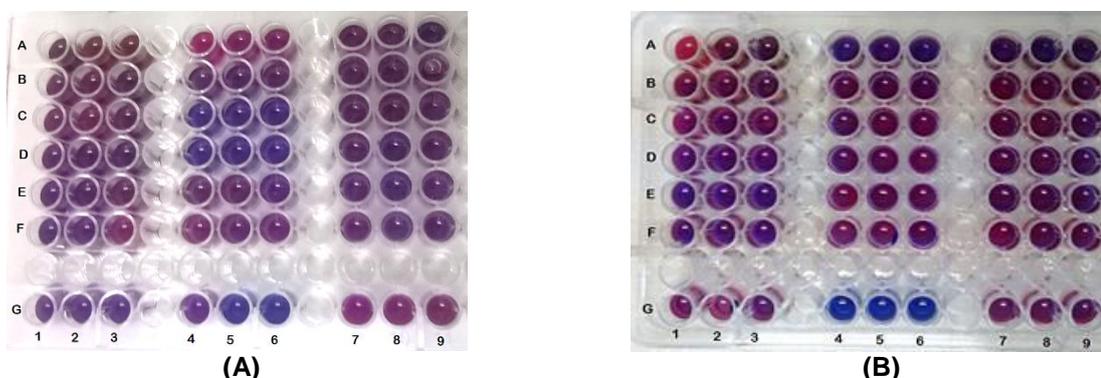
As análises de CIM e CBM foram desenvolvidas com diferentes concentrações do extrato de folhas de *T. catharinensis*. Os resultados estão apresentados na (Tabela 9).

**Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico de folhas de *Tabernaemontana catharinensis*.**

<i>Tabernaemontana catharinensis</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella bongori</i>
CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )	>5	0,125 a 0,062
CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )	>5	>5

Concentrações testadas do extrato: 5 a 0,005mg.mL<sup>-1</sup>.

Nas concentrações de 0,125 a 0,062 mg.mL<sup>-1</sup> ocorreu inibição mínima no crescimento da bactéria *Salmonella bongori*, o que pode ser visualizado na (Figura 15 A) através do poço D<sub>456</sub>. O mesmo não ocorreu para a bactéria *Staphylococcus aureus* (Figura 15 B), frente ao qual o extrato não apresentou ação inibitória mínima. Para estes bioensaios foram utilizados como controle o antibiótico clorfenicol (poços G<sub>456</sub>), o qual apresentou inibição confirmada pela intensidade da coloração azul, característica da inibição bactericida, e o solvente extrator etanol (poços G<sub>123</sub>), evidenciando que o solvente não interferiu na análise.



**Figura 15 - Microplacas de 96 poços para a análise de CIM frente os microrganismos *Salmonella bongori* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) após 24 horas de incubação.**

Portanto, a partir da análise CIM verificou-se que a planta apresentou ação inibitória mínima constatada a partir da mudança da coloração quando testadas sobre a bactéria *Salmonella bongori* e para a bactéria *Staphylococcus aureus* o mesmo não ocorreu.

Melo (2012) trabalhou com extrato bruto e frações de *Tabernaemontana solanifolia* e avaliou o potencial antibacteriano frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Neste trabalho foi verificado que o extrato bruto e suas frações de *T. solanifolia* apresentaram inibição nas concentrações de 1 a 2 mg.mL<sup>-1</sup>. No presente estudo, o extrato bruto de *Tabernaemontana catharinensis* tendo como solvente etanol necessitou de uma concentração menor para apresentar potencial antibacteriano sobre a bactéria *Salmonella bongori*, destacando assim sua atividade antibacteriana.

A ação inibitória dos extratos de *T. catharinensis* sobre a bactéria *Salmonella bongori* pode estar atribuída à composição química do extrato devido à presença de alcaloides, terpenos e compostos fenólicos nesta espécie (SILVA, 2010; MELO, 2012).

Para a análise de CBM o extrato não apresentou poder bactericida na faixa das concentrações testadas frente aos microrganismos *Salmonella bongori* e *Staphylococcus aureus*.

Os resultados deste estudo apresentaram padrões diferentes do encontrado por Gindri et al. (2011) que avaliaram potencial antibacteriano do extrato bruto particionado com os solventes, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Este autor ainda demonstrou que os extratos de *Tabernaemontana catharinensis* indicaram potencial antimicrobiano perante aos microrganismos gram-positivos e gram-negativos.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPIA DA AMOSTRA

A técnica de IV-TF (infravermelho com transformada de Fourier) permite inferir sobre os grupos funcionais presentes nas amostras, que apesar de serem misturas complexas pode-se identificar os grupos devido aos picos característicos presentes, tais como hidroxilas, carbonos com duplas ligações entre outros. O espectro de IV-

TF da amostra está representado na figura 16 e suas atribuições das bandas de absorção estão representados na tabela 10.

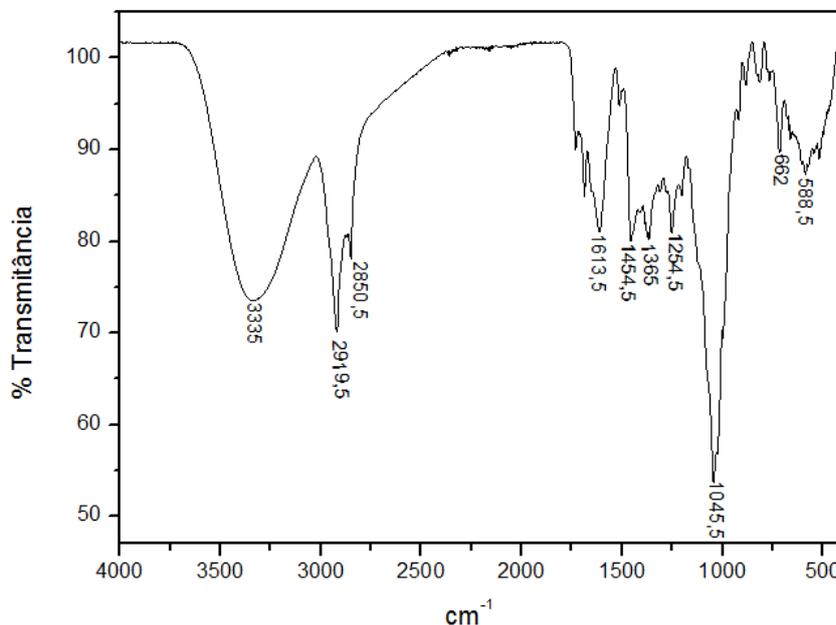


Figura 16 - Espectro de IV-TF da amostra

Tabela 10 - Atribuições aos picos obtidos no espectro de IV-TF.

Região do IV ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições*
3335	Estiramento de ligação O-H
2919/2850/1454/1254/1365	Estiramento de ligação C-H
1613	Deformação da ligação dupla C=C
1045	Estiramento da ligação C-O
662/588	Deformação da ligação dupla C-H

\* MELO (2012)

A utilização de espectroscopia na região do infravermelho é importante, pois auxilia como uma análise prévia para determinar a composição química da amostra investigada, apontando seus principais constituintes moleculares e contribuindo assim para uma posterior elucidação desses compostos.

## 5.6 IDENTIFICAÇÃO/QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

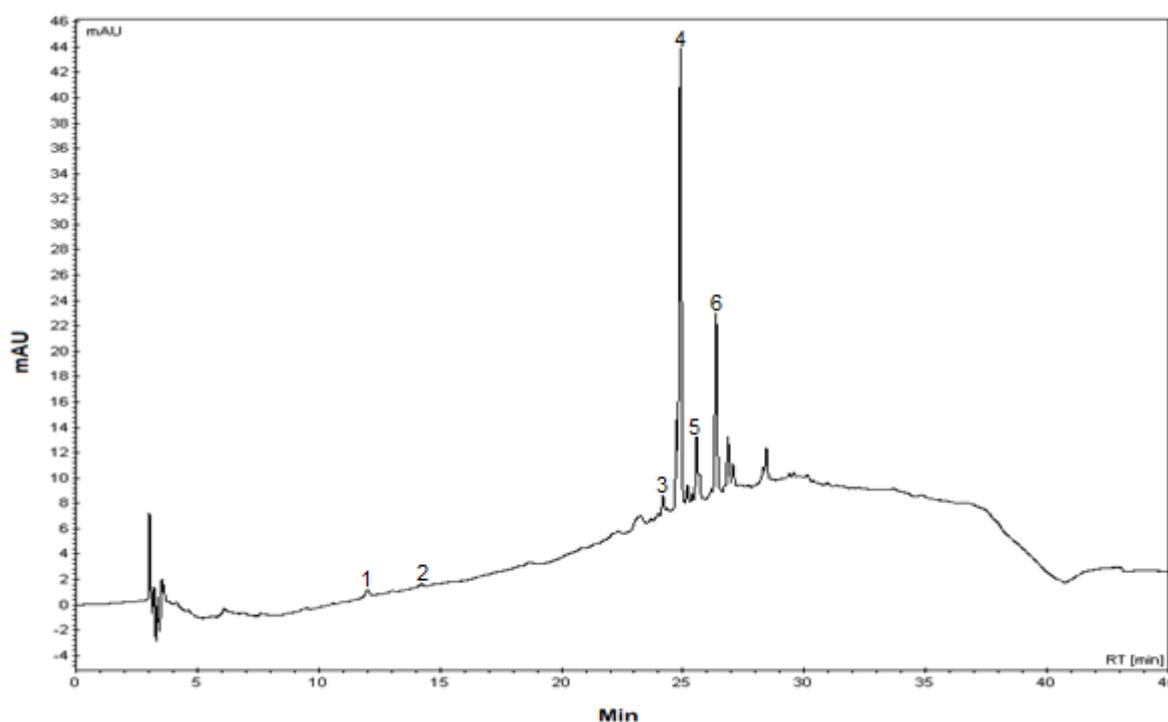


Figura 17 – Cromatograma de *T. catharinensis*: 1. catequina, 2. ácido vanílico, 3. rutina 4. ácido caféico, 5. miricetina 6. ácido salicílico

Os perfis obtidos por CLAE das amostras demonstraram similaridade, conforme Figura 17. É possível observar pela Tabela 11, que dos 11 compostos presentes na mistura padrão, apenas 6 sinais foram observados.

Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos de interesse segue-se condições do detector de absorção na região do Ultravioleta, para as curvas de calibração e das amostras, foi utilizado o detector de varredura ultravioleta-visível na faixa de 240 a 400 nm, bem como os cromatogramas foram obtidos em quatro diferentes comprimentos de onda, visto que os comprimentos de onda é específico para cada grupo de compostos: Como 280 nm, para derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico e ácido vanílico) e para catequina e epicatequina (flavanóis) (TOALDO et al., 2015) 300 nm, para ácido p-cumárico, ácido salicílico e o resveratrol (estilbeno) (VAN LEEUW et al., 2014); 320 nm, para

derivados dos ácidos hidroxicinâmicos(ácidos caféico e ferúlico) (TOALDO et al., 2015); e por fim 360 nm, para os flavonóis, rutina, quercetina e miricetina (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010).

**Tabela 11 - Quantificação dos compostos fenólicos por HPLC na melhor condição de extração de *T.cathariensis*.**

<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>Retenção (min)</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Equação</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>Teor (mg/100g)</b>
Ácido Vanílico	14,76	280	$y = 0,3056x - 0,0735$	0,9726	0,721	2,405	7,160
Ácido Cafeico	24,89	320	$y = 0,4095x + 1,3221$	0,9954	9,686	32,286	46,455
Rutina	24,75	360	$y = 0,4000x - 2,2577$	0,9622	16,933	56,442	57,154
Catequina	12,01	280	$y = 0,1032x - 0,1105$	0,9965	0,321	1,071	31,822
Ácido Salicílico	26,87	300	$y = 0,0297x + 0,0978$	0,6757	9,879	32,929	135,273
Miricetina	25,56	360	$y = 0,0282x - 0,1747$	0,956	18,585	61,950	134,667

LD: Limite de detecção em mg.mL<sup>-1</sup>, LQ: Limite de quantificação em mg.mL<sup>-1</sup>.

Segundo (MORAIS et al., 2005) estudando os extrasod de Cajazeira verificou que a planta tinha potencial contra o vírus Coxsakii B e Herpes Simplex I devido à atuação de alguns compostos, entre eles dois ésteres do ácido cafeico. Segundo (LOPES et al., 2005) mostra que em seu estudo, flavonoides como a rutina e a catequina têm capacidade antioxidante, devida a interação flavonoide e proteínas e que quando adicionadas a dieta alimentar melhoram o bom funcionamento do corpo., isto comprova que a planta *T. catharinensis* apresenta compostos que podem atuar para melhorar a saúde do homem, fazendo desta uma planta com grande capacidade antioxidante bem como detentora de vários compostos químicos que podem atuar contra vários tipos de doenças.

Os resultados deste estudo corroboram com o trabalho realizado por Melo (2012), que estudou a *Tabernaemontana solanifolia* onde o perfil cromatográfico dos extratos foi encontrado os mesmos compostos detectados neste trabalho.

## 6 CONCLUSÃO

Ao final deste estudo, pode-se concluir que através do delimitamento fatorial a melhor condição de extração de compostos bioativos em folhas de *T. catharinensis* ocorreu em 30 min, 65 °C e tendo como solvente extrator o etanol. O extrato apresentou-se com alto teor de compostos fenólicos bem como atividade antioxidante.

Por meio do estudo da *T. catharinensis* pode-se comprovar também a eficiência da atividade inibitória do extrato etanólico frente ao microrganismo gram-negativo *Salmonella bongori*, entretanto o mesmo nas concentrações estudadas não apresentou inibição frente ao microrganismo gram-positivo *Staphylococcus aureus*.

E através da caracterização pelo Infravermelho (FTIR) e pela identificação e quantificação por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), pode-se mensurar e determinar quais componentes químicos estão presentes no extrato.

Portanto, o estudo químico das folhas de *T. catharinensis* foi de grande relevância para o conhecimento do perfil químico da espécie, uma vez que, pode-se correlacionar com o bom potencial farmacológico in vitro apresentado pela espécie. Portanto, este estudo inédito, contribui também para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Tabernaemontana* e da família *Apocynaceae*.

## REFERÊNCIAS

- 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
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2007.
- BELDA-GALBIS, C. M. et al. Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. **Food Control**, v. 53, p. 212–216, jul. 2015.
- BOLIGON, A. A. et al. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 7–18, 2015.
- 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.
- CABRAL, I. S. R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008 [s.l: s.n.].
- CARPES, S. T. Estudo das características físico-químicas e biológicas do Pólen apícola de *Apis Mellifera L.* da região sul do brasil. 2008. 255f. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. **Norma M7-A6**. Vol. 23, 2005.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. 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.
- DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-Mate. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2010.
- EVANGELISTA, José. **Tecnologia de alimentos**. 2 ed. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2009. p. 652.

FLEMMING, José Sidney. Antioxidantes: importancia dos oleos essenciais e dos compostos fenólicos. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/antioxidantes-importancia-dos-oleos-t397/141-p0.htm>>. Acesso em: 20 maio. 2016.

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.

IGNOATO, Marlene Capelin. Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de Aeschynomene fluminensis e de Machaerium hirtum ( Fabaceae ) de Porto Rico - Paraná. 2012. Dissertação, Doutorado Universidade Estadual de Maringá, 2012.

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.

LIMA, J. F. et al. Avaliação de diferentes substratos na qualidade fisiológica de sementes de melão de caroá [ Sicana odorifera ( Vell .) Naudim ]. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 163–167, 2010.

LOPES, R. M. et al. Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatinina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos. **Rev. Bras. Farm.** 86, n. 1, p. 35–38, 2005.

MATTOS, G. Extração e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides de eugenia pyriformis cambess usando diferentes solventes. p. 34, Trabalho de conclusão de curso, Campo Mourão, 2013.

MELO, A. M. M. Estudo químico e atividade biológica de tabernaemontana solanifolia A. DC. (APOCYNACEAE). Dissertação, Doutorado Universidade de Brasília. 2012.

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

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.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 2, p. 169–177, 2005.

NICOLA. C, Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica de Tabernaemontana catharinensis. Dissertação, Universidade De Caxias Do Sul. 2013.

PEREIRA, C. G. et al. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO<sub>2</sub>+ethanol: An evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, n. 1, p. 51–61, 2004.

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

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. e MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Vol. 27, No.5, 771-780, 2004.

ROCKENBACH, I. Compostos Fenólicos, Ácidos Graxos e Capacidade Antioxidante do Bagaço da Vinificação de Uvas Tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). Dissertação (Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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.

RUFINO, M. S. M. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. 2008. 237f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2008.

SHEN, X. et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, jan. 2014. black highland barley. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1003–1012, 2016.

SILVA, N. C. C. S. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. n. 14, 2010.

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.

TEIXEIRA, FELIPE DE A.; SILVA, CARMELIRA G. DA, .DPPH. Química Nova Interativa. Disponível em:  
<[http://qnint.sbgq.org.br/qni/popup\\_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv\\_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6OUaLje9uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q](http://qnint.sbgq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6OUaLje9uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q)> Acesso em: 01 agosto 2016.

TOALDO, I. M. et al. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipidperoxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, n. 173, p. 527–535, 2015.

VAN LEEUW, R.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMESB, J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 36, p. 40–50, 2014.

WIJNGAARD, H. H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, p. 134–140, 2010.