

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

VIVIANE SEMIM

EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO CELULAR DE COMPOSTOS
FENÓLICOS PRESENTES NA CASCA DO PINHÃO

Araucaria angustifolia (Bertol.) O. Kuntze

LARANJEIRAS DO SUL - PR

2023

VIVIANE SEMIM

**EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO CELULAR DE COMPOSTOS
FENÓLICOS PRESENTES NA CASCA DO PINHÃO**

Araucaria angustifolia (Bertol.) O. Kuntze

Dissertação de Mestrado, apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leda Battestin Quast
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini

LARANJEIRAS DO SUL - PR

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Semim, Viviane

EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO CELULAR DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA CASCA DO PINHÃO *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze / Viviane Semim. -- 2023.67 f.:il.

Orientadora: Doutora Leda Battestin Quast

Co-orientadora: Doutora Margarete Dulce Bagatini
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. Pinhão, compostos fenólicos, avaliação celular..
I. Quast, Leda Battestin, orient. II. Bagatini, Margarete Dulce, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

VIVIANE SEMIM

EXTRAÇÃO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO CELULAR DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA CASCA DO PINHÃO *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA (BERTOL.) O. KUNTZE*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 24/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br LEDA BATTES TIN QUAST
Data: 25/10/2023 15:34:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Dra. Leda Battestin Quast - UFFS Presidente/Orientadora

MARGARETE DULCE
BAGATINI:00440641012
MARGARETE DULCE
BAGATINI:00440641012
Dados: 2023.12.06 19:25:16 -0300

Prof.^a. Dra. Margarete Dulce Bagatini - UFFS Coorientadora

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO PAULO BENDER
Data: 07/12/2023 10:20:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS 1º Membro



Prof.^a. Dra. Roberta Letícia Kruger – Unicentro 2º Membro

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO KEY YAMAZAKI
Data: 07/12/2023 17:06:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Key Yamazaki – UFFS 3º membro

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO TORMEN
Data: 08/12/2023 21:37:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luciano Tormen – UFFS Suplente

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), aos professores e técnicos do PPGCTAL.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Leda Battestin Quast que sempre esteve presente, pela amizade, dedicação e contribuições ao longo destes dois anos.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagattini pela disponibilidade, e que, de igual maneira, contribuiu fortemente para a realização desta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Vania Zanella Pinto que, desde o início, se prontificou a participar e a contribuir com esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Paulo Bender que, desde o início, se prontificou a participar e a contribuir com esta pesquisa.

À Msc. Raquel Borin, pelas horas de laboratório compartilhadas e pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

À Msc. Alana Patrícia da Silva, pela disponibilidade e engajamento para a realização dos tratamentos em células de melanoma.

Ao Msc. Odinei pela disponibilidade e engajamento para a realização das análises do extrato no HPLC.

Aos colegas de mestrado, e agora meus amigos, em especial Daniela Ragazzon, Mariana F. Pinheiro, Márcia M. Gomes pelo apoio incondicional de vocês e pelo crescimento que desenvolvemos juntas. Ao Yuri E. M. Gandin pelo auxílio durante a execução dos experimentos. Compartilhamos bons momentos!

Aos familiares, compadres, amigos, colegas professores, diretores, alunos, que acompanharam essa etapa, muito obrigada pelo carinho e compreensão em todos os momentos. Em especial ao Bruno Bianchini e Vinícius Fagundes pelo apoio durante este trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais Nelmira e José Semim, meus irmãos Diogo e Júlia Semim e meu esposo Eloi de Almeida pelo suporte em todas horas e apoio nas minhas escolhas. Não consigo expressar em palavras todo meu amor e gratidão.

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze é encontrada principalmente na região sul do Brasil, conhecida por muitos nomes populares como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-Paraná, pinho, araucária. Os pinhões amadurecem nas pinhas, são sementes grandes que apresentam reservas nutritivas. A casca do pinhão, rica em compostos bioativos, é considerada um resíduo agroindustrial não explorado, representa em torno de 20% do peso total do pinhão, sendo normalmente descartada no ambiente. Os compostos bioativos se destacam pelas propriedades que exercem como atividade antioxidante, anti-inflamatória e de agentes coadjuvantes no tratamento de doenças. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante do extrato da casca de pinhão *in natura*, por meio das técnicas de maceração e extração assistida por ultrassom e investigar a ação antitumoral do extrato em células de melanoma cutâneo da linhagem SK-Mel-28 e A-375. As cascas foram separadas das sementes e secas por 24 horas a 40 °C em estufa com convecção forçada de ar (Cienlab). Posteriormente foram trituradas e peneiradas (partículas entre 0,210 e 0,250mm). Os extratos das cascas de pinhão *in natura* foram avaliados quanto aos compostos fenólicos totais (CFT) - pelo método de Folin-Ciocalteu - atividade antioxidante total (AAT) - pelo método de sequestro de radicais DPPH e ABTS e atividade antitumoral em células de melanoma cutâneo (MC). Na extração de compostos fenólicos totais (CFT), o maior teor de CFT foi de 15,51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ massa seca obtida pela extração assistida por ultrassom durante 30 minutos. Na avaliação da atividade antioxidante por DPPH e ABTS, a maceração não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, porém pelo método de ultrassom durante 30 minutos, o ABTS apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), com 1202,44 $\mu\text{M TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$ sendo posteriormente este o tratamento aplicado em células MC. A atividade antitumoral foi avaliada pelo método de viabilidade celular (MTT) expondo as células de melanoma ao extrato bruto e por diluição seriada por 24 horas. Nos tratamentos com as células SK-Mel-28 não houve atividade de inibição celular. O tratamento nas células A-375 resultou na diminuição significativa da viabilidade celular apresentando atividade antitumoral nas concentrações testadas ($p < 0,001$); ($p < 0,0001$), quando comparado ao controle, exceto na diluição 1:100, onde as células tratadas não sofreram alteração quando comparadas ao controle. As concentrações onde o fator de diluição do extrato de *Araucaria angustifolia* foram 1:1000 e 1:10 foram capazes de inibir o crescimento de células tumorais

em aproximadamente 30 % em 24 horas de tratamento. Nas concentrações onde o fator de diluição foi de 1:1 e com extrato bruto observou-se maior taxa de citotoxicidade, apresentando uma redução da proliferação celular com percentual abaixo de 50% em relação ao controle nesses tratamentos. O extrato para as células A-375 demonstrou resultado efetivo para impedir a migração celular em potencial como agente coadjuvante para o tratamento de melanoma cutâneo.

Palavras-chave: compostos bioativos; atividade antioxidante; aplicação biológica; melanoma cutâneo.

ABSTRACT

The *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze is found mainly in the southern region of Brazil, known by many popular names such as Brazilian pine, Paraná pine, pine, araucaria. Pine nuts mature in cones, they are large seeds that have nutritional reserves. The pine nut shell, rich in bioactive compounds, is considered unexploited agro-industrial waste, representing around 20% of the total weight of the pine nut, and is normally discarded into the environment. Bioactive compounds stand out for the properties they exert as antioxidant, anti-inflammatory and supporting agents in the treatment of diseases. In this context, the objective of this work was to evaluate the phenolic composition and antioxidant activity of *in natura* pine nut shell extract, through maceration and ultrasound-assisted extraction techniques, and to investigate the anticancer action of the extract on cutaneous melanoma cells of the SK-Mel-28 and A-375. The coats were separated from the seeds and dried for 24 hours at 40 °C in a forced air convection oven (Cienlab). Shells were subsequently crushed and sieved (0.210 and 0.250mm). The extracts from fresh pine nut shells were evaluated for total phenolic compounds (CFT) - by the Folin-Ciocalteu method - total antioxidant activity (AAT) - by the DPPH and ABTS radical scavenging method and antitumor activity in cutaneous melanoma cells (MC). In the extraction of total phenolic compounds (CFT), the treatments did not show a significant difference. The highest CFT content was 15.51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry mass obtained by ultrasound-assisted extraction for 30 minutes. In the evaluation of antioxidant activity by DPPH and ABTS, maceration did not show a significant difference between treatments, however, using the ultrasound method for 30 minutes, ABTS showed a significant difference ($p < 0.05$), with 1202, 44 $\mu\text{M TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$, which was subsequently applied to MC cells. Anticancer activity was evaluated by the cell viability method (MTT) by exposing melanoma cells to the crude extract and by serial dilution for 24 hours. In treatments with SK-Mel-28 cells, they did not show cell inhibition activity. Treatment on A-375 cells resulted in a significant decrease in cell viability, presenting antitumor activity at the concentrations tested ($p < 0.001$); ($p < 0.0001$), when compared to the control, except in the 1:100 dilution, where the treated cells did not change when compared to the control. The concentrations where the dilution factor of the *Araucaria angustifolia* extract were 1:1000 and 1:10 were able to inhibit the growth of tumor cells by approximately 30% in 24 hours of treatment. At concentrations where the dilution factor was 1:1 and with crude

extract, a higher rate of cytotoxicity was observed, showing a significant reduction in cell proliferation with a percentage below 50% in relation to the control in these treatments. The extract for A-375 cells demonstrated effective results in preventing cell migration, potentially as a supporting agent for the treatment of cutaneous melanoma.

Keywords: bioactive compounds; antioxidant activity; biological application; cutaneous melanoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Árvore da <i>Araucaria angustifolia</i> | 19 |
| Figura 2 - Semente de pinhão cortada longitudinalmente | 19 |
| Figura 3 - Esquema do processo de extração por maceração utilizado | 31 |
| Figura 4 - Esquema do processo de extração por ultrassom utilizado..... | 32 |
| Figura 5 - Diluição seriada para tratamento de células de melanoma cutâneo..... | 36 |
| Figura 6 - Viabilidade de células de melanoma humano in vitro SK-Mel-28 tratadas através de diluição seriada com extrato de casca de pinhão in natura por 24h e avaliadas pelo método MTT | 44 |
| Figura 7 - Viabilidade de células de melanoma humano in vitro A-375 tratadas através de diluição seriada com extrato de casca de pinhão <i>in natura</i> | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Rendimentos dos extratos aquosos (mL e %) da casca <i>in natura</i> da <i>Araucaria angustifolia</i> | 38 |
| Tabela 2 - Concentração de Fenólicos Totais e Capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS | 39 |
| Tabela 3 - Compostos Fenólicos identificados por HPLC-MS no extrato da casca de pinhão <i>in natura</i> obtido pelo método de extração em ultrassom por 30 min. | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|--|----|--|
| <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze | O. | - <i>Araucaria angustifolia</i> Bertolini Otto Kuntze |
| <i>A. angustifolia</i> | | - <i>Araucária angustifolia</i> |
| ABTS | | - 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina)6-ácido sulfônico |
| AAE | | - Extrato aquoso da casca de pinhão <i>in natura</i> da <i>Araucaria Angustifolia</i> |
| AAT | | - Atividade antioxidante total |
| AGS | | - Linhagem celular Adenocarcinoma gástrico |
| ATCC | | - American Type Culture Collection do inglês: coleção de microorganismos Norte americana |
| A-375 | | - Linhagem celular de melanoma cutâneo |
| CB | | - Compostos bioativos |
| CFT | | - Compostos fenólicos totais |
| <i>C. olitorius</i> | | - <i>Corchorus olitorius</i> (planta conhecida como juta) |
| DMEM | | - Meio Dulbecco |
| DMSO | | - Dimetilsulfóxido |
| DNA | | - Ácido Desoxiribonucleico |
| DPPH | | - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| EAC | | - Extrato diluição seriada |
| EAU | | - Extração assistida por ultrassom |
| EAG | | - Ácido gálico equivalente |
| EDTA | | - Ethylenediamine tetraacetic acid do inglês: Ácido etilenodiaminotetracético |
| g | | - Grama |
| h | | - Horas |
| HaCat | | - Linhagem celular não-tumoral de queratinócitos (células presentes na epiderme) |
| HPLC-MS/ESI | | - High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass |

spectrometry do inglês: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray

| | |
|----------------------|---|
| IARC | - Internacional Agency for Research on Cancer |
| IBGE | - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| INCA | - Instituto Nacional de Câncer |
| IUCN | - Internacional Union for Conservation of Nature |
| Kg | - Quilograma |
| KHz | - Quilo-hertz |
| L | - Litro |
| MC | - Melanoma cutâneo |
| <i>M.officinalis</i> | - <i>Melissa officinalis</i> (planta conhecida como erva-cidreira) |
| mg | - Miligrama |
| min | - Minutos |
| mL | - Mililitro |
| mm | - Milímetro |
| mM | - Milimol |
| m/z | - Razão entre massa e carga elétrica |
| MTT | - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio |
| nm | - Nanômetro |
| ppm | - Parte por milhão |
| SK-Mel- 28 | - Linhagem celular de melanoma cutâneo |
| SUIT-2 | - Linhagem celular adenocarcinoma pancreático |
| TEAC | - Capacidade antioxidante equivalente em Trolox |
| UFFS-LS | - Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Laranjeiras do Sul |
| % | - Porcentagem |
| µm | - Micrograma |
| µL | - Microlitro |
| µM | - Micromol |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 OBJETIVOS..... | 17 |
| 1.1.1 Objetivo geral..... | 17 |
| 1.1.2 Objetivos específicos..... | 17 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 PINHÃO | 18 |
| 2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO..... | 20 |
| 2.3 EXTRATOS DE PLANTAS | 22 |
| 2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS..... | 24 |
| 2.5 CÂNCER..... | 26 |
| 2.5.1 Câncer..... | 26 |
| 2.5.2. Câncer de pele não melanoma e melanoma | 27 |
| 2.5.3. Fitoquímicos e o Câncer..... | 28 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 MATERIAL | 29 |
| 3.1.1 Matéria prima | 29 |
| 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 29 |
| 3.2.1 Preparo das cascas do pinhão para uso..... | 29 |
| 3.2.2 Métodos de extração..... | 30 |
| 3.2.2.1 Extração por Maceração | 31 |
| 3.2.2.2 Extração Assistida por Ultrassom | 31 |
| 3.2.3 Determinação do rendimento em volume do extrato | 32 |
| 3.2.4 Métodos analíticos | 33 |
| 3.2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais..... | 33 |
| 3.2.4.2 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil)..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4.3 Avaliação da atividade antioxidante por ABTS (2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico) | 34 |
| 3.2.4.4 Perfil de compostos bioativos..... | 34 |
| 3.2.5 Avaliação da atividade antitumoral do extrato | 35 |
| 3.2.5.1 Cultivo Celular | 35 |
| 3.2.5.2 Tratamento das células | 35 |
| 3.2.5.3 Ensaio de viabilidade celular | 36 |
| 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 36 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 4.1. SECAGEM, DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA E TEOR DE UMIDADE DA CASCA DO PINHÃO | 37 |
| 4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO..... | 38 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH E ABTS..... | 39 |
| 4.4 PERFIL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO DA <i>Araucaria angustifolia</i> POR HPLC-MS | 41 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS | 43 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 48 |
| 6 REFERÊNCIAS | 49 |

1 INTRODUÇÃO

O pinhão, consumido principalmente na região sul do Brasil, vem sendo reconhecido como um alimento benéfico a saúde devido a seu alto valor nutricional e na prevenção de doenças, bem como utilizado como ingrediente diferenciado na gastronomia.

Por mais que a principal fonte de reserva das sementes da *Araucaria angustifolia* seja o amido, este também é uma fonte de carboidratos, fibras, magnésio, cobre, baixos teores de proteínas, de lipídios e açúcares solúveis (Muccillo, 2009; Cladera-Oliveira *et al.*, 2012). As concentrações dos constituintes variam conforme o estágio de desenvolvimento da semente (Guidolin, 2016). Os pinhões possuem também compostos fenólicos que se encontram em maior quantidade nas sementes cozidas, por conta da migração dos compostos da casca para as sementes após o processo de cocção (Cordenunsi *et al.*, 2004; Daudt, 2016).

Além do potencial de promoção à saúde, o pinhão apresenta um bioresíduo, geralmente descartada, a casca, destacando-se por ser aproveitada como subproduto de fonte de fibras e compostos antioxidantes (Costa; Helm; Tavares, 2012; Santos *et al.*, 2017).

A casca do pinhão, rica em compostos fenólicos, é considerada um resíduo agroindustrial não explorado, que representa em torno de 20% do peso total do pinhão, sendo normalmente descartada no ambiente (Peralta *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Trojaike *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante e atividade antimicrobiana, uma gama de efeitos promotores de saúde, podendo ser utilizados em diversos segmentos na indústria de alimentos (Sant'anna *et al.*, 2016; Trojaike *et al.*, 2019).

Da fração da semente do pinhão, a casca era o componente com menor exploração (Cladera-Oliveira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014), porém, diversos autores vêm estudando o extrato da casca de pinhão como potencial antioxidante devido seu conteúdo de compostos fenólicos. O principal grupo de compostos fenólicos presentes no revestimento do pinhão são os taninos condensados e hidrolisáveis de alta massa molecular, compostos estes que possuem maior atividade antioxidante que os compostos fenólicos simples (Koehnlein *et al.*, 2012; Thys; Cunha, 2015).

Os antioxidantes estão presentes de forma natural ou intencional nas gorduras e alimentos para retardar o aparecimento dos fenômenos de oxidação, mantendo intactas suas características sensoriais. Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos não devem produzir efeitos fisiológicos negativos, cores, odores nem sabores anômalos. A ingestão de alimentos que possuem substâncias antioxidantes contribui para prevenir a oxidação

proveniente dos processos biológicos, ou seja, de fatores endógenos ao organismo (Degáspari; Waszczynski, 2004; Achkar *et al.*, 2013).

Compostos antioxidantes sintéticos são utilizados como conservantes de alimentos, no entanto, apresentam certo grau de toxicidade para o organismo. Antes da década de 80, antioxidantes sintéticos eram amplamente utilizados na prevenção da oxidação sofrida em alimentos industrializados, porém, a partir dessa década, iniciaram-se estudos destinados à produção de antioxidantes de fontes naturais, uma vez que foi detectado que antioxidantes sintéticos causam efeitos negativos e deletérios no organismo quando utilizados em doses elevadas (Broinizi *et al.*, 2007; Achkar *et al.*, 2013). Cabe ressaltar que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos, como chás, vinhos e frutos foi relacionado com a baixa incidência de doenças degenerativas por isso a importância desses compostos na dieta e na conservação de alimentos (Achkar *et al.*, 2013).

Entre os antioxidantes naturais, os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante de grande importância em processos de inibição do risco de doenças cardiovasculares e do estresse oxidativo, que está relacionado a patologias crônico-degenerativas, como diabetes, câncer e processos inflamatórios (Helt; Navas; Gonçalves, 2018; Santos *et al.*, 2018).

O consumo de fitoquímicos dietéticos apresentam efeitos benéficos à saúde em diversas áreas, incluindo propriedades quimiopreventivas e terapêuticas do câncer. Além disso, sugere-se que o uso de fitoquímicos combinados com antioxidantes reduzem o risco de desenvolver câncer, portanto, embora existam medicamentos em ensaios clínicos, é relevante a continuidade pela busca de extratos vegetais que exibam atividade antitumoral sem causar efeitos colaterais em células saudáveis (Serafini; Testa, 2009; Helt; Navas; Gonçalves, 2018).

Os compostos fenólicos são encontrados com grande facilidade na natureza, porém, por apresentarem diversos grupos com características distintas, é necessário a utilização de metodologias de extração adequadas garantindo a preservação estrutural desses compostos sem perder sua bioatividade, seja para aplicações de interesse nutricional, segmentos industriais e outros associados a prevenção e tratamento de doenças.

A partir do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os diferentes métodos de extração de compostos fenólicos da casca de pinhão *in natura* e identificar atividade antioxidante dos extratos no tratamento de células tumorais melanoma cutâneo A-375 e SK-Mel-28.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Determinar e avaliar o teor de compostos fenólicos presentes na casca de pinhão *in natura* obtidos por diferentes métodos de extração, e investigar a capacidade citotóxica dos extratos em células de melanoma cutâneo na linhagem A-375 e SK-Mel-28.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extratos da casca de pinhão avaliando os métodos de maceração e extração assistida por ultrassom;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteu e da capacidade antioxidante frente ao método do DPPH e ABTS;
- Avaliar os extratos obtidos por diferentes métodos em relação a seus compostos fenólicos e atividade antioxidante;
- Identificar a capacidade sequestradora de radicais livres do extrato da casca de pinhão em meio biológico;
- Avaliar a atividade antitumoral (citotóxica e/ou antiproliferativa) de extratos provenientes da casca de pinhão *in natura* obtidos pelos métodos de maceração e extração assistida por ultrassom;
- Avaliar o efeito biológico do extrato da casca de pinhão *in natura* em células de melanoma cutâneo nas linhagens A-375 e SK-Mel-28.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PINHÃO

O pinhão é largamente consumido no sul do Brasil e após seu cozimento em água a sua casca é geralmente descartada. A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze, é uma conífera nativa da América do Sul encontrada no Sul e Sudoeste do Brasil e Norte da Argentina (Conforti; Lupano, 2008). Sua semente é grande, denominada pinhão, de cor marrom, contém grande quantidade de reservas nutritivas, além de fibras alimentares. Por conta de seu alto valor nutritivo, e por fazer parte da alimentação da fauna silvestre, é muitas vezes utilizado na alimentação de animais. Tem forte apelo cultural, pois seu consumo remete a memórias familiares, de infância, rurais e folclóricas (Guidolin, 2016; Leivas *et al.*, 2013; Peralta *et al.*, 2016; Godoy *et al.*, 2018).

A exploração descontrolada desta espécie devido a qualidade da sua madeira, quase devastou a Floresta de Araucárias, reduzindo grande parte da sua população, sendo classificada como espécie ameaçada pela Internacional Union for Conservation of Nature (IUCN). Isto provocou impactos ambientais à diversidade biológica, bem como a cadeia alimentar do ecossistema (Carvalho, 2010; Dorigam de Matos Furlanetto *et al.*, 2019). O período de incidência de sua semente, o pinhão, ocorre entre os meses de abril e julho, de acordo com a variedade, época em que o pinhão está com seu desenvolvimento completo. O pinhão é um dos alimentos tradicionais da Região Sul, está presente em eventos culturais e é utilizado como fonte de renda de agricultores e comerciantes (Gama, 2006; Schweitzer *et al.*, 2014).

No Brasil, as árvores são conhecidas popularmente como “pinheiro-do-paraná” ou “pinheiro-brasileiro” (Figura 1) e representam grande importância para o reflorestamento e a conservação da Mata Atlântica (Branco *et al.*, 2014; Dorigam de Matos Furlanetto *et al.*, 2019). A pinha, fruto onde estão aglomerados os pinhões, possuem formato de uma esfera compacta com diâmetro entre 15 cm e 20 cm, chegando a pesar, em média 2,0 Kg. Para formação da pinha, entre a floração, polinização, crescimento e amadurecimento, é necessário um tempo de até três anos. A semente, denominada como pinhão tem cerca de 5 cm de comprimento, com aproximadamente 8,6 g e é recoberta por uma casca lisa de cor castanha, perdendo a viabilidade em apenas 120 dias (Araújo; Guiotoku, 2010; Batista, 2014).

Figura 1 - Árvore da *Araucaria angustifolia*

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A casca é a parte externa da semente e possui três camadas, que protegem a amêndoa, a mais externa, cujos tecidos se dispõem longitudinalmente, apresenta uma coloração que vai desde o branco-amarelado até o vermelho escuro. A camada intermediária é bastante delgada e seus tecidos estão dispostos transversalmente, ela é responsável pela maior resistência à casca do pinhão, sua cor é branco-amarelada externamente e castanha clara na face interna. A terceira e última camada é a mais fina e membranácea das três, e está disposta longitudinalmente e possui cor castanha clara na face externa e rosada internamente. No centro da amêndoa há o embrião, um filamento de $\frac{4}{5}$ de seu comprimento. A amêndoa é branca-rósea-clara, rica em reservas energéticas, constituída pela massa bastante amilácea, sendo ela a parte comestível do pinhão (Gama, 2006; Godoy *et al.*, 2018). Na Figura 2 apresenta-se o aspecto geral da semente de pinhão cortada longitudinalmente.

Figura 2 - Semente de pinhão cortada longitudinalmente



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

As qualidades do pinhão não se resumem às características de sabor e aroma. O consumo de pinhão pode fornecer nutrientes relevantes e de caráter funcional, com potencial de promoção à saúde (Godoy *et al.*, 2021). Dados parciais de pesquisas realizados pela Embrapa Florestas, com pinhões coletados em diferentes épocas do ano, indicaram algumas variações na composição físico-química das sementes (Heberle *et al.*, 2015).

Em relação ao processamento do pinhão, estudos apontam diferenças na composição físico-química do pinhão cru e cozido em água, principalmente no conteúdo de umidade devido a absorção da água durante o cozimento (Godoy *et al.*, 2021).

O teor de açúcares solúveis na semente de *Araucaria angustifolia* é relativamente baixo, especialmente após o cozimento. A glicose é o açúcar mais comum, seguido pela frutose e sacarose. Treze ácidos graxos foram identificados na semente comestível, sendo os principais, ácido linoleico (18:2n-6), oleico (18:1n-9) e palmítico (16:0) (Cordenunsi *et al.*, 2004; Silva; Garcia; Franciscato, 2016); (Corrêa; Helm, 2010).

A semente de *Araucaria angustifolia* é formada por revestimento externo, tegumento interno, amêndoa ou polpa e embrião. Sua massa compreende de 7 a 9 g por semente, e a casca representa cerca de 22 % do total (Cordenunsi *et al.*, 2004; Cladera-Olivera *et al.*, 2012).

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Na maioria dos casos, os compostos antioxidantes são obtidos de diversas fontes e por diferentes meios de extração, em que fatores como mecanismo, tempo, temperatura e tipo de solvente são fundamentais para a eficiência da extração (Bonilla *et al.*, 2015).

Os extratos naturais nos últimos anos, tem sido estudado com maior atenção, por apresentarem caráter terapêutico e custos menos elevados para realização de pesquisa e medicamentos (Kotovicz *et al.*, 2021).

Segundo a ANVISA (2007), extratos são produtos obtidos por esgotamento, a frio ou a quente, a partir de produtos de origem animal, vegetal ou microbiana com solventes permitidos. Devem conter os princípios sápidos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural. Podem apresentar-se como: Extratos líquidos: obtidos sem a eliminação do solvente ou eliminando-o de forma parcial; e Extratos secos: obtidos com a eliminação do solvente. Os extratos vegetais mais comuns no mercado brasileiro são os da soja e do coco, entretanto, outros tipos de matérias-primas podem ser utilizados, como

amêndoas, castanhas, aveia, semente da abóbora e cravo-da-índia (Oliveira *et al.*, 2016; Ribeiro; Lima; Oliveira, 2020).

A busca por compostos bioativos de origem natural com alta capacidade antioxidante aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas, principalmente devido ao seu potencial preventivo e no tratamento de doenças (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Compostos bioativos de plantas podem ser extraídos por várias técnicas clássicas de extração. Muitas destas técnicas são baseadas em diferentes graus de extração dos solventes utilizados sozinhos ou em combinações. Dentre as técnicas mais clássicas de extração sólido-líquido é possível citar a extração por Soxhlet, maceração e hidrodestilação.

Com o desafio em encontrar novas tecnologias, a fim de reduzir o consumo de energia, para atender às exigências legais sobre as emissões, produtos/segurança e controle dos processos, e por redução de custos, aumento da qualidade, bem como a funcionalidade (Chemat *et al.*, 2017), novas e promissoras técnicas de extração são criadas constantemente, tais como: extração assistida por enzimas; por micro-ondas; campo elétrico pulsado; por fluido supercrítico; por líquido pressurizado; e ainda extração assistida por ultrassom (Azmir *et al.*, 2013; Vazquez-Roig; Picó, 2015). Além dos métodos extrativos, são diversos os fatores que influenciam na extração, como a parte do material vegetal utilizada, a origem deste, o grau de processamento, o tamanho da partícula, o solvente utilizado, o tempo de extração, temperatura, polaridade e concentração do solvente (Tiwari *et al.*, 2011; Ribeiro; Lima; Oliveira, 2020). O solvente utilizado e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na extração de polifenóis e conseqüentemente na capacidade antioxidante (Rockenbach *et al.*, 2008).

O processo de maceração consiste em colocar uma matriz sólida em contato com solvente (água e/ou compostos orgânicos), ocorrendo a transferência de massa entre os componentes da mistura. O tamanho das partículas da matriz sólida, tipo de solvente, relação quantitativa solvente/matriz, o tempo de contato, sendo variáveis que influenciam as cinéticas de difusão e o rendimento (Naviglio *et al.*, 2007; Gizir; Turker; Artuvan, 2008; Naviglio; Ferrara, 2008; Cujic *et al.*, 2016; Kotovicz *et al.*, 2021).

A vantagem da maceração está na possibilidade de utilização de solventes orgânicos ou inorgânicos e o baixo custo da técnica, este último motivado pela realização em temperatura ambiente e simplicidade dos equipamentos utilizados. As principais desvantagens dessa técnica, é um processo demorado, para a completa extração pode levar horas, dias, semanas. Para amenizar esse processo de espera, pode-se utilizar a temperatura, fator que

umenta o coeficiente de difusão e a concentração no equilíbrio na fase líquida (Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Linares *et al.*, 2010; Jensen; Zanoelo, 2013; Kotovicz *et al.*, 2021).

Entre os métodos de extração que geram menor quantidade de resíduos de solventes orgânicos e permitem maior eficiência na recuperação de compostos bioativos de plantas, destaca-se a extração indireta assistida por ultrassom na qual a amostra é submetida a um banho de ultrassom (Silva *et al.*, 2021).

Esse método se baseia na propagação das ondas ultrassônicas e das forças de cavitação resultantes, nas quais as bolhas geradas colapsam intensamente promovendo o rompimento de células do tecido, devido a tensões locais de cisalhamento e formação de zonas de alta pressão e temperatura (Kluczkovski *et al.*, 2021). Dessa forma, a liberação de substâncias intracelulares das plantas no solvente é favorecida. Fatores como tempo e temperatura de extração, concentração da amostra e proporção de solvente podem influenciar a extração de metabólitos secundários através desse método (Silva *et al.*, 2021).

As principais vantagens da extração assistida por ultrassom são a simplicidade do método utilizado, o baixo custo, a quantidade reduzida de reagentes utilizados, a possibilidade de uso de diferentes solventes e um menor tempo necessário para realização do processo, se comparado a outros métodos.

Os métodos de extração abordados podem ser combinados a fim de aumentar a eficiência da extração. Os processos que utilizam maceração e ultrassom são considerados técnicas verdes de extração, pois, comparados as técnicas convencionais causam menores impactos ambientais devido ao menor consumo de energia e pela redução do consumo de solventes orgânicos os quais podem ser substituídos por água por exemplo (Sumere *et al.*, 2018).

2.3 EXTRATOS DE PLANTAS

As plantas produzem metabólitos secundários que possuem atividade biológica, sendo importante na área econômica, farmacológica e tecnológica, e são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica, na tentativa de obter efeito mais eficaz e com menor impacto nas características do produto, uma vez que os compostos naturais apresentam efeitos mais leves, porém mais duradouros (Cortés-Rojas *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários (ou metabólitos especializados), são altamente específicos e desempenham um papel importante na evolução dos vegetais e na interação com os seres vivos (Borges; Amorim, 2020).

Os extratos de plantas também são muito utilizados como alternativa para o uso de determinados aditivos na produção de alimentos. Quando comparados aos compostos sintéticos, oferecem diversas vantagens, tais como sua baixa toxicidade, não representam risco para o ambiente, apresentam amplo modo de ação e são derivados de recursos renováveis. Estudos evidenciam que extratos vegetais podem apresentar potencial herbicida, fungicida e inseticida, com grande eficiência (Kobayashi; Amaral, 2018).

Os compostos naturais estão ganhando atenção por estarem associados a uma série de bioatividades incluindo ações como antibacterianas, anti-inflamatórias, antialérgicas, antivirais, antitrombóticos, vasodilatadores e anticancerígenos (Xie *et al.*, 2015). O número de estudos é limitado, mas evidências disponíveis indicam que esses fitoquímicos são bioacessíveis e biodisponíveis em humanos. Esses dois parâmetros são importantes, pois estão associados a uma série de bioatividades e são capazes de afetar o início e a progressão de vários processos patogênicos (Bolling *et al.*, 2011).

Em estudo realizado por Mota *et al.* (2014), os autores obtiveram extratos metanólicos da casca e polpa de sementes de *Araucaria angustifolia* identificando a presença de moléculas com capacidade de aprisionamento de radicais livres (como compostos polifenólicos, flavonóides e proantocianinas). Em outro estudo, Silva *et al.* (2014) aplicaram um extrato obtido da casca do pinhão (etanol a 70% em água) como inibidor de α -amilase sendo que os autores observaram que os taninos do extrato eram ricos em procianidinas (catequina, epicatequina e ésteres de ácido gálico) e destacaram que o extrato foi considerado um inibidor eficaz de α -amilase salivar humana e pancreática suína. Além disso, concluíram que o extrato de casca de pinhão também foi eficaz na diminuição dos níveis de glicose no sangue em ratos.

No estudo desenvolvido por Oliveira *et al.* (2015), um extrato de casca de pinhão provou ser um inibidor eficaz da lipase pancreática e diminuir efetivamente os níveis plasmáticos de triglicerídeos em camundongos. Além disso, Branco *et al.* (2015) demonstraram que um extrato aquoso de brácteas de *Araucaria angustifolia* apresentou citotoxicidade seletiva e atividade pró-apoptótica em células HEP-2 de carcinoma de laringe. De acordo com Daudt *et al.* (2015) realizaram um estudo sobre a caracterização de extrato aquoso da casca do pinhão e observou que apresentava quantidades significativas de compostos fenólicos; seu uso como um agente antioxidante foi considerado relevante.

Para de Oliveira (2021) os extratos da casca do pinhão apresentaram-se como uma alternativa à inibição das enzimas (α -amilase e colinesterases), bem como a atividade anti-carcinogênica demonstrou atividade citotóxica para os diferentes tipos de células tumorais avaliadas, sendo mais efetivo para o carcinoma cervical.

No estudo de Sallai *et al.* (2020) propriedades dos extratos qualificaram as sementes de *Araucaria angustifolia* como uma fonte de proteína com propriedades de inseticida natural e por conter um inibidor de protease com potencial para ser uma molécula bioativa em diferentes células tumorais.

No processamento do pinhão, as cascas são tratadas como resíduos, no entanto, elas apresentam maior teor de compostos fenólicos quando comparadas com as suas sementes (Freitas *et al.*, 2018). Estudos realizados por Sales *et al.* (2019) utilizando pinhão com extração aquosa, mostraram que o teor de compostos fenólicos totais foram de $88,03 \pm 6,47$ mg EAG.g⁻¹ para as cascas e $50,31 \pm 4,99$ mg EAG.g⁻¹ para as sementes. Adicionalmente, os compostos fenólicos presentes na casca do pinhão, que são termolábeis, migram para as sementes durante o seu processo de cozimento (Henriquez *et al.*, 2008; Koehnlein *et al.*, 2012). A presença de compostos fenólicos na casca de pinhão é um aspecto tecnológico importante, pois em geral, alto teor de compostos fenólicos se correlaciona com alta atividade antioxidante (Bastos, 2016; Reis *et al.*, 2020). A presença de compostos fenólicos em cascas de alimentos também foi observada em cascas com farelo de arroz verde ($203,2 \mu\text{g/g}$ massa seca) (Dors *et al.*, 2009) e em cascas de buriti ($24,9 \pm 0,3 \mu\text{g EAG/g}$) (Leite *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos são um grupo quimicamente heterogêneo que variam nas diferentes partes da planta, as quais são afetadas pelo clima, práticas de cultivo, genética, fatores pré-colheita e pós-colheita (Ogah *et al.*, 2014; Persic *et al.*, 2017). Além desses fatores, os compostos fenólicos apresentam variações quando extraídos por diferentes métodos e solventes e essa diversidade metodológica dificulta a comparação direta de resultados obtidos em literatura (Bastos, 2016; Reis *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2018).

Souza *et al.* (2014), ressaltam a importância da valorização de extratos de diversas partes das plantas, consideradas como resíduo, mas que apresentam compostos de interesse, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e seletiva para doenças crônicas e câncer (Cladera-Oliveira *et al.*, 2008; Daudt *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015; Branco *et al.*, 2015; Sant'anna *et al.*, 2016; Trojaike, 2018).

2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS

O consumo de frutas e vegetais tem sido associado à redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório, ambos relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas. Este efeito benéfico é vinculado em parte pela presença dos compostos bioativos presentes nestas plantas (Kaulmann *et al.*, 2014).

Os compostos bioativos são metabólitos secundários sintetizados por plantas, que podem ser extraídos e empregados em nutracêuticos, alimentos processados e também na indústria farmacêutica (Puri *et al.*, 2012). Agem como antioxidantes com a capacidade de prevenir e reparar danos causados pela oxidação, e podem estar presentes em alguns nutrientes (vitaminas e minerais) e em substâncias não nutricionais como os fitoquímicos (Beta; Duodu, 2016). Os metabólitos secundários apresentam diversas estruturas químicas, podendo ser classificadas em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Borges *et al.*, 2020). Um dos mecanismos pelos quais estes compostos exercem seus efeitos benéficos a saúde é na atuação como antioxidantes capazes de reduzir ou prevenir eventuais efeitos nocivos, causados pelos radicais livres ao corpo humano (Mizgier *et al.*, 2016).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos principais, os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os flavonoides podem ser considerados o maior grupo, com aproximadamente 4 mil estruturas identificadas e classificadas (Karakaya, 2004; Liu, 2004). Dentre os compostos fenólicos, destaca-se as antocianinas, pigmentos naturais, responsáveis pelas cores atraentes de flores, frutas e verduras. De modo geral, compostos como as cumarinas nas plantas, podem estar relacionadas à atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, e ainda atividade anticarcinogênica (Lu *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013). Dentre os esteroides, dos benefícios à saúde humana destaca-se a diminuição nos níveis de colesterol e riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e inibição do surgimento de certos tipos de tumores malignos (Cunha *et al.*, 2016; Pereira; Cardoso, 2012). Os taninos apresentam duplo efeito na saúde humana, podendo apresentar efeito benéfico como ação antitumoral e antimicrobiana e efeitos antinutricionais, quelando vitaminas e minerais, hipertensão arterial, reumatismo, cicatrizante e anti-inflamatório (Chung; Wei; Johnson, 1998; Rodrigues *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

O uso de recursos naturais e subprodutos, reconhecidos como fonte de nutrientes e de compostos bioativos, não são totalmente aproveitados. É o que ocorre com o pinhão, semente comestível da *Araucaria angustifolia*, que após seu cozimento tem sua casca, retirada e descartada, considerada um bioresíduo rico em taninos, porém, pouco explorada (Silva *et al.*, 2014). Estima-se que aproximadamente 10 toneladas de cascas de pinhão sejam descartadas anualmente no Brasil. Devido ao longo período de decomposição, tem sido realizado estudos visando uma melhor utilização desse resíduo (Peralta *et al.*, 2016; Zortéa-Guidolin *et al.*, 2017; Bello-Pérez *et al.*, 2006).

A valorização da casca como resíduo poderá ser melhor aproveitada e explorada uma vez que toda a cadeia produtiva do pinhão seja adequada, passando da informalidade para produção dentro dos critérios tecnológicos de processamento de alimentos.

Compostos fenólicos e polifenóis são frequentemente detectados em quantidades mais altas nas cascas das sementes de pinhão. Sua ocorrência na parte externa da semente faz com que tenha um papel de defesa das plantas. Dando ainda tonalidade característica da casca de pinhão (Mota *et al.*, 2014). As cascas e brácteas possuem como principais compostos fenólicos a catequina, epicatequina, quercetina e apigenina (Souza *et al.*, 2014).

Diversas são as evidências de que esses compostos apresentam potencialidade para serem utilizados pelos seres humanos a fim de promover saúde e reduzir os riscos de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimer (Puri *et al.*, 2012).

Neste contexto, a investigação dos teores e a identificação de compostos bioativos na *Araucaria angustifolia* é parte importante dos estudos que visam elucidar o potencial biológico dessa espécie nativa, pois as atividades avaliadas podem ser atribuídas a uma ou mais classes de compostos bioativos que fazem parte da sua composição fitoquímica (Yamamoto *et al.*, 2004).

2.5 CÂNCER

2.5.1 Câncer

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. Verifica-se uma transição dos principais tipos de câncer observados nos países em desenvolvimento, com um declínio dos tipos de câncer associados a infecções e ao aumento daqueles associados à melhoria das condições socioeconômicas com a incorporação de hábitos e atitudes associados à urbanização (sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros) (Bray *et al.*, 2018).

Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo desenvolvendo um processo denominado de metástase. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos

epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (INCA, 2022).

O câncer surge a partir de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no Ácido Desoxiribonucleico (DNA) da célula, que passa a receber instruções erradas para as suas atividades. O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere-se e dê origem a um tumor visível. Os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos são os responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor (INCA, 2022).

A metástase ocasionada pelas células tumorais necessita de um processo denominado de migração celular. Os compostos bioativos possuem a capacidade de atuar na modulação da migração celular e são importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos, pois podem modular funções biológicas das células vivas, demonstrando ação positiva em células tumorais, além de poderem ser utilizados como agentes coadjuvantes em processos de quimioterapia (Tashiro; Imoto, 2016).

2.5.2. Câncer de pele não melanoma e melanoma

Entre os diversos tipos de cânceres existentes, o câncer de pele, subdivide-se em câncer de pele não melanoma e melanoma. O câncer de pele não melanoma, apresenta altos percentuais de cura, se for detectado e tratado precocemente. Entre os tumores de pele, é o mais frequente e de menor mortalidade, porém, se não tratado adequadamente pode deixar mutilações expressivas (INCA, 2022).

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão. O câncer de pele do tipo melanoma, de menor incidência, tem se apresentado como a forma mais invasiva pela elevada capacidade de formar metástases (INCA, 2022). Em decorrência disso, o melanoma cutâneo é classificado como o tipo de câncer com maior capacidade de ocasionar mortes pela característica extremamente invasiva, ocasionando o aumento do índice de mortalidade e de números de casos nos últimos anos (Pelinson *et al.*, 2019).

Segundo estudos do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022), no Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer,

483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Este é estimado como o mais incidente, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%) casos novos. O impacto do câncer no mundo, em 2020, baseado nas estimativas do Global Cancer Observatory (Globocan), elaboradas pela International Agency for Research on Cancer (IARC), aponta que ocorrerão 19,3 milhões de casos novos de câncer no mundo (18,1 milhões, se forem excluídos os casos de câncer de pele não melanoma).

2.5.3. Fitoquímicos e o Câncer

O século XX apresentou um avanço extraordinário nas pesquisas de produtos naturais, importantes para a saúde humana, provenientes de compostos fitoquímicos, propiciando a descobertas de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica e também estimulando a importância do conceito da quimioprevenção. A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (Costa-Lofuto *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2020).

Os fitoquímicos e seus derivados são compostos biologicamente ativos e demonstraram efeitos anticancerígenos (Majrashi, *et al.*, 2023). O tratamento de combate ao câncer pode envolver diferentes estratégias como excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, variando de acordo com o tipo de tumor e estágio de seu desenvolvimento. Um ponto importante a ser levado em consideração em relação a estes tratamentos convencionais, é que eles apresentam efeitos colaterais como náusea, vômito e caquexia, devido a danos ocasionados a células e tecidos saudáveis. Por esta razão e pelo fato de que esta doença apresenta altos índices de mortalidade, há uma contínua busca por compostos que possam contribuir no tratamento dela, buscando uma ação mais eficiente nas células cancerosas e menos agressivas às células não tumorais (Ali *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2015). Os fitoquímicos alcaloides, saponinas, triterpenos, glicosídeos, polifenóis, entre outros, apresentam propriedades antitumorais (Gautam; Mantha; Mitall, 2014; Oliveira *et al.*, 2020). Em estudos com extratos aquosos da *Araucaria angustifolia*, foi possível observar efeitos antiproliferativos seletivos mediados por disfunção mitocondrial e ativação de apoptose em células de carcinoma de laringe humano HEP-2 (Branco *et al.*, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias utilizadas no presente trabalho para a avaliação e obtenção do extrato da casca de pinhão *in natura* por diferentes métodos de extração com posterior aplicação biológica. Serão apresentadas nas etapas iniciais, obtenção e caracterização da matéria-prima e dos extratos. Na sequência, será demonstrado, através dos métodos analíticos, a determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) e avaliação da atividade antioxidante (AAT) pelos métodos DPPH e ABTS, e posterior resultado do tratamento com extrato em células de melanoma cutâneo (MC) nas linhagens A-375 e SK-Mel-28. Os experimentos e tratamentos foram realizados nos Laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul Campus Laranjeiras do Sul (UFFS) – PR e Campus Chapecó – SC.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria prima

O pinhão (semente da *Araucaria angustifolia*) foi adquirido em local especializado na comercialização desse produto em Laranjeiras do Sul – PR, em junho de 2022. Este estabelecimento comercializava o pinhão proveniente da comunidade rural Serro Verde, no município de Campina do Simão - PR. O município de Campina do Simão, se estende por 448,4 km², situando a 77 Km ao sul-Oeste de Guarapuava. Situado a 994m de altitude, tendo as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 25°4' 8" Sul, Longitude: 51°49'31" Oeste.

As sementes selecionadas foram separadas em porções de 1 Kg em embalagens de polietileno, posteriormente armazenadas em ultrafreezer (-80°C), até o momento de sua utilização.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Preparo das cascas do pinhão para uso

Na etapa inicial do procedimento, as sementes foram descascadas individual e manualmente, sendo separadas as cascas para utilização. Inicialmente determinou-se o conteúdo de umidade das cascas em estufa à 105°C por 24 horas, ponto no qual a massa (g) se tornou constante. A umidade em base seca e base úmida foi calculada, conforme metodologia

do Adolfo Lutz (2008). As análises foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso como percentual de umidade (%) conforme a Equação 1.

$$U = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

U= teor da umidade em percentual (%)

M_i = massa inicial da placa (g)

M_f = massa final da amostra mais a placa (g)

M_i = massa inicial da amostra (g)

A primeira etapa de preparação da amostra foi a secagem das cascas *in natura*, importante para garantir que a amostra permaneça estável durante o armazenamento, evitando o crescimento de microrganismos e uma possível perda de compostos bioativos. Como forma de melhorar as condições de durabilidade da casca, após o seu descascamento, as cascas foram submetidas a secagem em estufa com renovação e convecção forçada de ar (Cienlab) a 40°C por 24 h. Após esta etapa, as amostras foram resfriadas e a sua umidade foi determinada.

Na etapa seguinte, as cascas desidratadas foram moídas em equipamento provido de lâminas cortantes (JL Colombo BR 6L) e posteriormente padronizou-se as amostras através de peneiramento, por meio de peneiras com malhas de aberturas diferentes acopladas entre si e com movimentação manual. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e acondicionado no freezer (-18°C) até o procedimento de extração.

3.2.2 Métodos de extração

As análises químicas de quantificação e extração de compostos bioativos, bem como a quantificação da atividade antioxidante por radicais sintéticos foram realizadas nos Laboratórios de Engenharia de Alimentos da UFFS-LS. As amostras secas, trituradas e peneiradas foram submetidas aos processos de extração. As condições definidas para os métodos de extração foram baseadas em análises preliminares realizadas.

3.2.2.1 Extração por Maceração

O processo de extração por maceração foi realizado sob proteção da luz em temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em cada experimento utilizou-se 15g de casca de pinhão *in natura* (previamente desidratada e moída) e 100 mL de água destilada em copo de béquer de 250 mL. As amostras foram armazenadas ao abrigo de luz com diferentes tempos de extração de 12, 24 e 48 h. Decorrido o tempo de extração, as amostras foram filtradas por 2 h com papel qualitativo Whatman[®] n.1 (Sigma-Aldrich, Alemanha). As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração em ultrafreezer (-80°C), devidamente identificadas para posteriores análises. O processo de extração por maceração foi realizado em triplicata real de experimento em cada tempo de extração. A Figura 3 apresenta um esquema das etapas dos experimentos de extração por maceração.

Figura 3 - Esquema do processo de extração por maceração utilizado



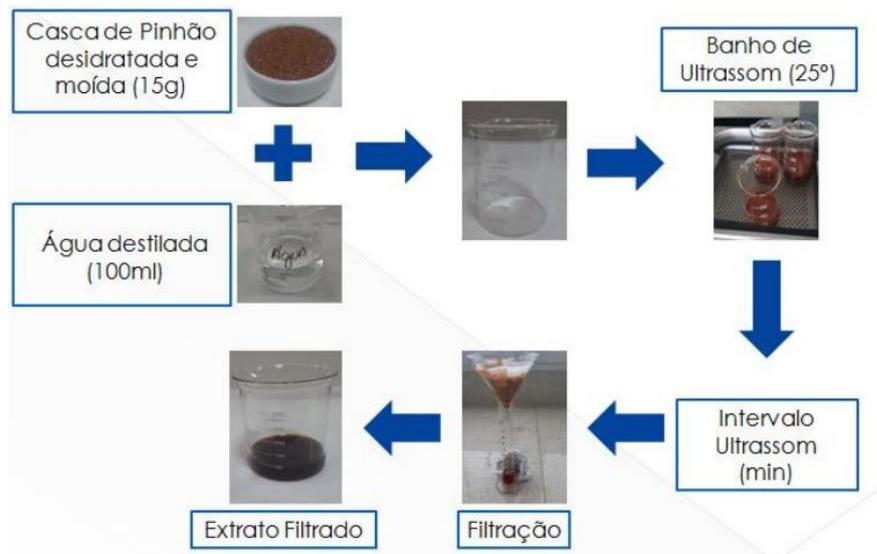
Fonte: Elaborado pela autora (2023)

3.2.2.2 Extração Assistida por Ultrassom

Na extração assistida por ultrassom, para cada corrida utilizou-se 15g de casca de pinhão *in natura* (previamente desidratada e moída) e 100 mL de água destilada em copo de béquer de 250 mL. As amostras foram imersas em banho ultrassônico (MTB-Científica-Modelo:SSBuc-6L-Potência 1000Watts) com temperatura programada de 25°C e frequência ultrassônica padrão de 40 KHz. A extração foi realizada nos intervalos de tempo de 10, 20 e 30 min. Decorrido o tempo de extração, as amostras foram filtradas por 2 h com papel qualitativo Whatman[®] n.1 (Sigma-Aldrich, Alemanha). As amostras foram acondicionadas

em frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração em ultrafreezer (-80°C), devidamente identificadas para posteriores análises. O procedimento foi realizado em triplicata real de processo. A Figura 4 apresenta um esquema das etapas dos experimentos de extração por ultrassom.

Figura 4 - Esquema do processo de extração por ultrassom utilizado



Fonte: elaborado pela autora (2023)

3.2.3 Determinação do rendimento em volume do extrato

Para a determinação do rendimento em volume de extrato, os extratos coletados foram mensurados de acordo com o descrito por Santos (2017). O volume de extrato coletado na filtração (V_e , mL) foi determinado com uma proveta graduada de 50 mL e o rendimento em volume foi calculado com base no volume inicial de solvente adicionado para extração (V_s , mL) pela Equação (2).

$$R(\%v.v^{-1}) = \frac{V_e}{V_s} .100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

R= rendimento em volume do extrato (%)

V_e = volume do extrato coletado após filtração (mL)

V_s = volume inicial de solvente adicionado para extração (mL)

3.2.4 Métodos analíticos

3.2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinação de compostos fenólicos totais, seguiu-se a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Utilizou-se a microplaca com poços de 280 μL , misturando com 200 μL de água destilada, 14 μL de amostra, 22 μL de carbonato de sódio (7,5%, p/v) e 44 μL do reagente Folin–Ciocalteu. A placa foi mantida em repouso, na ausência da luz, por 2 horas. Posteriormente, a absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japão). A metodologia foi aplicada para os extratos obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom nos diferentes tempos dos experimentos. Uma curva padrão foi elaborada com ácido gálico nas concentrações de 0; 4,46; 8,92; 17,85; 35,7 e 71,42 mg de EAG/L. O conteúdo fenólico do extrato após calculado foi expresso em microgramas de equivalente de Ácido Gálico por grama de massa seca de casca de pinhão ($\mu\text{g EAG.g}^{-1}$). As análises foram realizadas no mínimo em triplicata.

3.2.4.2 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil)

Amostras de extrato de casca de pinhão obtidos por maceração e extração assistida por ultrassom nos diferentes tempos dos experimentos foram utilizadas para a determinação da atividade antioxidante, pelo método DPPH, em triplicata de acordo com o descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas modificações. Para curva de calibração utilizou-se uma solução estoque Trolox 800 $\mu\text{mol/L}$ (5 mg de Trolox diluído em metanol até completar um balão volumétrico de 25 mL). Para o procedimento da análise foi realizado o preparo da solução estoque de DPPH (24 mg de DPPH em 100 ml de metanol) e solução de uso do radical DPPH (10 mL da solução estoque de DPPH diluída em 45 mL de metanol), preparada no dia e ajustada absorbância 515 nm. Nas microplacas foram adicionados 35 μL do extrato e 265 μL da solução de uso do radical DPPH (recentemente preparada), com posterior agitação (5s) e mantida em repouso na ausência de luz por 6 min em temperatura ambiente. A leitura no espectrofotômetro (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japão) deu-se em intervalos de 10 min até sua estabilização. A absorbância final (tempo de estabilização) foi utilizada para padronizar todas as amostras e a curva padrão. Os resultados para expressar a atividade antioxidante frente ao radical DPPH foram em $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox) por grama de massa seca. As análises foram realizadas no mínimo em triplicata.

3.2.4.3 Avaliação da atividade antioxidante por ABTS (2,2-Azino-bis (3-etilbenzotiazolína)-6-ácido sulfônico)

Outro método utilizado para medir a atividade antioxidante foi através da geração do radical ABTS, de cor azul esverdeada, formado pela reação de Persulfato de Potássio com ABTS, produzindo a sua oxidação. A atividade antioxidante da amostra foi determinada pela descoloração do ABTS, medindo-se a redução do radical a uma absorvância de 734nm. O método utilizado foi de acordo com o descrito por Re *et al.* (1999) com algumas modificações. Para curva de calibração utilizou-se uma solução estoque Trolox 800 $\mu\text{mol/L}$ (5 mg de Trolox diluído em metanol até completar um balão volumétrico de 25 mL). Para o procedimento da análise foi realizado o preparo das soluções estoque do ABTS 7 mM (192 mg de ABTS em água destilada até completar o volume de 50 mL em balão volumétrico), solução Persulfato de Potássio 140 mM (378,4 mg de Persulfato de Potássio em água destilada até completar volume de 10 mL em balão volumétrico) e a solução do radical ABTS 7 mM (5 mL da solução estoque de ABTS com 88 μL da solução de Persulfato de Potássio mantida na ausência de luz por 16 h em temperatura ambiente).

Em microplacas foram adicionados 35 μL do extrato e 265 μL da solução do radical ABTS recentemente preparada e com absorvância ajustada, com posterior agitação (5s) e mantida em repouso na ausência de luz por 6 min em temperatura ambiente, para posterior leitura no espectrofotômetro (734 nm). Os resultados para expressar a atividade antioxidante frente ao radical ABTS foram em $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ (capacidade antioxidante equivalente em Trolox) por grama de massa seca. As análises foram realizadas no mínimo em triplicata.

3.2.4.4 Perfil de compostos bioativos

Os compostos bioativos do extrato da casca de pinhão obtido por 30 minutos de ultrassom foram determinados utilizando um Cromatógrafo Líquido Shimadzu acoplado ao detector de massa (HPLC-MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI (-)) seguindo a metodologia descrita por Arruda *et al.* (2018), com adaptações. A coluna utilizada foi Shim-pack VP-ODS fase reversa (150mm x 2,0mm (I.D) x 4,6 μm). Utilizou-se como fase móvel A: Ácido Fórmico 0,3% e fase móvel B: metanol puro. Utilizou-se modo gradiente a um fluxo de 0,4 mL/min e a temperatura do forno a 40°C. A curva padrão foi realizada diluindo os padrões, individualmente, em metanol na concentração em 1000 ppm. A partir destas soluções foi preparada a mistura dos padrões nas concentrações de 1; 2,5; 5; 7,5;10 mg/L.

Foram avaliadas onze substâncias padrões, sendo: quercetina ($m/z=301$), miricetina ($m/z=317$), kaempferol ($m/z=285$), ácido cafeico ($m/z=179$), epicatequina ($m/z=289$), pirocatecol ($m/z=109$), ácido gálico ($m/z=169$), epigallocatequina ($m/z=305$), ácido p-cumárico ($m/z=163$), ácido sirínico ($m/z=197$), flavona ($m/z=223$). A identificação e quantificação dos compostos bioativos foi avaliada conforme a razão massa/carga (m/z) de cada composto e o tempo de retenção dos padrões injetados.

3.2.5 Avaliação da atividade antitumoral do extrato

3.2.5.1 Cultivo Celular

Para a realização do cultivo celular, foram utilizadas células de linhagem de melanoma cutâneo da linhagem SK-Mel-28 e A-375 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), com código ATCC (American Type Culture Collection) HTB-72. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, acrescido de 1% de antibiótico e antifúngico, e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com saturação de 5% de CO₂ (Thermo Scientific™). Ao atingirem a confluência de 80-95%, foram destacadas das garrafas de cultivo utilizando Tripsina/EDTA e semeadas em placas de 96 poços para o ensaio de viabilidade celular.

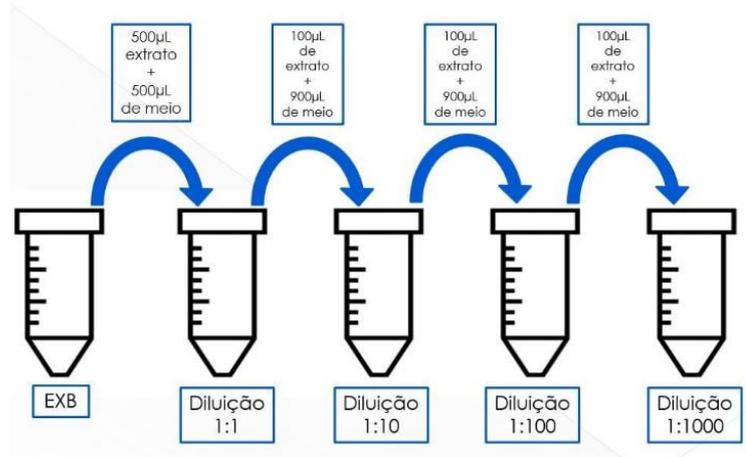
Nos testes com tratamento das células, foram escolhidos os extratos obtidos da extração por ultrassom no tempo de 30 minutos.

3.2.5.2 Tratamento das células

Para realização dos ensaios, as células foram tratadas por 24 h com o extrato de casca de pinhão *in natura*. Para isso, o extrato foi diluído utilizando o meio de cultivo DMEM.

As concentrações de tratamento do extrato foram realizadas por meio de diluição seriada, conforme (Figura 5). O controle da reação foi realizado utilizando apenas o meio DMEM. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células viáveis em relação ao controle.

Figura 5 – Diluição seriada para tratamento de células de melanoma cutâneo



Fonte: elaborada pela autora (2023).

3.2.5.3 Ensaio de viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular utilizou-se o reagente de ensaio MTT (Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) na concentração de 5 mg/mL. Ao ser facilmente incorporado às células viáveis, o MTT é reduzido, pela atuação de enzimas desidrogenases formando o sal formazan, de coloração roxo-púrpura quando solubilizado com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo a intensidade de cor proporcional à quantidade de células viáveis (Fukui; Yamabe; Zhu, 2010). A absorbância foi medida em comprimento de onda de 570 nm usando um espectrofotômetro de microplaca (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific™). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células viáveis em relação ao controle.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios dos compostos fenólicos e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente usando o software Jamovi® (2.3.21). Os resultados do ensaio de viabilidade celular foram avaliados com o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA), versão 9.0. Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade segundo Shapiro-Wilk e os outliers foram excluídos segundo o teste de Grubbs. A análise estatística foi determinada por análise de variância One-Way ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três réplicas de experimentos independentes com nível de confiança de 95%. Nos testes de aplicação de viabilidade celular os níveis de confiança foram maiores que 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SECAGEM, DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA E TEOR DE UMIDADE DA CASCA DO PINHÃO

As sementes de pinhões no presente estudo apresentaram em média $6,4\text{cm}\pm 0,01$ de comprimento, com massa média de $7,12\text{g}\pm 0,15$. Em relação as sementes, as cascas dos pinhões, apresentaram em média $1,076\text{g}\pm 0,06$ representando 23,7% da sua massa, sendo esse um valor típico para esse produto (Fonseca *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2022; Peralta *et al.*, 2016) sendo considerável potencial de estudo, o reaproveitamento deste resíduo.

O teor de umidade da casca de pinhão *in natura* foi de $29,8\%\pm 0,01$ (base úmida) e $0,424\pm 0,02$ g água g^{-1} massa seca (base seca). Nessas condições, a casca pode apresentar deterioração se não for armazenada adequadamente. Por se tratar de um produto biológico, suas características físico-químicas podem sofrer alterações de acordo com as condições ambientais. A umidade da casca do pinhão é elevada quando comparada a umidade média de grãos 12,35% (Raschen *et al.*, 2014), refletindo na importância da sua secagem para prolongar seu tempo de armazenamento. Em estudos realizados por Reis (2020) e Albuquerque *et al.* (2017), os valores de umidade (base úmida) determinados para casca de pinhão *in natura* foram de $42,80\%\pm 0,19$ e $52,81\%\pm 0,15$, sendo estes valores maiores do que os apresentados neste estudo. Esse fato está relacionado as condições de clima e colheita do produto. Após a desidratação das cascas de pinhão, a umidade passou a ser de $10,23\% \pm 0,004$ (base úmida) e $0,115\text{g}\pm 0,005$ g água g^{-1} massa seca (base seca), sendo essa redução significativa ($p < 0,05$; $F_{\text{calc}} = 686,89$) quando comparada com a umidade inicial. A casca de pinhão desidratada apresentou valor próximo ao determinado por Jacinto *et al.* (2016) em resíduos da cadeia produtiva de pinhão (9,91%). A partir das amostras desidratadas, após o processo de trituração e peneiramento, optou-se por utilizar amostras padronizadas com partículas de tamanho entre 0,210 e 0,250 mm visando uma uniformidade no processo de extração, visto que o tamanho da partícula pode ocasionar alterações no rendimento e na composição do extrato, interferindo na transferência de massa durante a extração (Borges *et al.*, 2017; Maksimovic; Jasna; Skala, 2012).

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO

A Tabela 1 apresenta o volume de extrato obtido para cada processo de extração, e rendimento, expresso em volume obtido conforme equação descrita no item 3.2.3.

Tabela 1 - Rendimentos dos extratos aquosos (mL e %) da casca *in natura* da *Araucaria angustifolia*

| Método de extração | Volume médio de extrato (mL) | Rendimento médio por volume de extrato (%) |
|--------------------|------------------------------|--|
| Maceração 12h | 34,00±1,00 ^c | 34,00%±0,01 ^c |
| Maceração 24h | 34,33±1,15 ^{bc} | 34,33%±0,01 ^{bc} |
| Maceração 48h | 34,66±1,52 ^{bc} | 34,66%±0,015 ^{bc} |
| Ultrassom 10min | 36,33±0,57 ^{abc} | 36,33%±0,05 ^{abc} |
| Ultrassom 20min | 36,66±0,57 ^{ab} | 36,66%±0,05 ^{ab} |
| Ultrassom 30min | 37,66±0,57 ^a | 37,66%±0,05 ^a |

Fonte: Elaborado pela autora (2023) Letras minúsculas sobrescritas às médias indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Nos processos de extração do presente trabalho, utilizou-se solvente aquoso como forma de promover uma extração sem a utilização de solventes orgânicos com a dissolução de compostos polares presentes em diferentes estruturas vegetais (Benelli *et al.*, 2010). A utilização da água como solvente apresenta uma série de vantagens por ser atóxica, acessível, de baixo custo e não agredir o meio ambiente, também se destacando pela economia de tempo e energia ao não requerer a etapa de evaporação/concentração (Gil-Chávez *et al.*, 2013). Essa característica na utilização do extrato aquoso, foi relevante na aplicação direta no estudo das células de melanoma cutâneo SK-Mel-28 e A-375. Os processos de extração utilizados (maceração e ultrassom), embora tenham características diferenciadas de operação, são processos de extração sólido-líquido, onde se observa que existe uma interação física entre a matriz sólida (casca do pinhão) com o solvente (água). A casca do pinhão apresenta estrutura fibrosa, sendo essa uma característica que favorece a absorção da água (Nóbrega *et al.*, 2021). O volume médio de extrato coletado variou de 34% (maceração 12 h) até 37,66% (ultrassom 30 min), sendo que esses valores podem sofrer alterações de acordo com as condições de processo utilizadas.

4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH E ABTS

Os resultados da Concentração dos Fenólicos Totais e Capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, obtidos dos extratos aquosos das cascas de pinhão, nas diferentes condições de extração são apresentados na Tabela 2. Para fins de visualização, os resultados de Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante foram expressos em unidades diferentes.

Tabela 2 - Concentração de Fenólicos Totais e Capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS.

| Método de Extração | Fenólicos totais em mg EAG.100g ⁻¹ g de massa seca | Fenólicos totais em µg EAG.g ⁻¹ g de massa seca | Capacidade antioxidante DPPH em mM TEAC.100g ⁻¹ g massa seca | Capacidade antioxidante DPPH em µM TEAC.g ⁻¹ g massa seca | Capacidade antioxidante ABTS em mM TEAC.100g ⁻¹ g massa seca | Capacidade antioxidante ABTS em µM TEAC.g ⁻¹ g massa seca |
|--------------------|---|--|---|--|---|--|
| Maceração 12h | 1,33±0,12 ^a | 13,13±1,28 ^a | 96,72±2,44 ^a | 967,21±24,48 ^a | 90,56±2,34 ^a | 905,63±23,46 ^a |
| Maceração 24h | 1,26±0,07 ^a | 12,61±0,71 ^a | 105,32±4,67 ^a | 1053,21±46,74 ^a | 81,57±12,16 ^a | 815,70±121,67 ^a |
| Maceração 48h | 1,23±0,09 ^a | 12,29±0,92 ^a | 97,04±11,86 ^a | 970,42±118,65 ^a | 94,28±3,14 ^a | 942,80±31,42 ^a |
| Ultrassom 10min | 1,45±0,07 ^a | 14,56±0,72 ^a | 108,17±2,50 ^a | 1081,78±25,05 ^a | 106,93±8,30 ^b | 1069,33±83,06 ^b |
| Ultrassom 20min | 1,51±0,007 ^a | 15,12±0,07 ^a | 108,55±1,70 ^a | 1085,50±17,06 ^a | 111,48±4,97 ^b | 1114,88±49,79 ^b |
| Ultrassom 30min | 1,55±0,07 ^a | 15,51±0,77 ^a | 115,98±0,76 ^a | 1159,87±7,63 ^a | 120,24±0,69 ^a | 1202,44±6,94 ^a |

Fonte: elaborada pela autora, (2023).

*Os valores referem-se a média de diferentes tempos de extração ± desvio padrão; e médias na mesma coluna, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas de forma separada para cada a extração por maceração e extração por ultrassom.

A análise quantitativa dos compostos fenólicos totais (Tabela 2) mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no teor de compostos fenólicos nos diferentes tempos de extração nos métodos utilizados.

Na extração por maceração (Tabela 2) a análise quantitativa da capacidade antioxidante pelo método de DPPH e ABTS não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos, indicando, que a capacidade antioxidante desses compostos é semelhante nos diferentes tempos de extração por maceração. Isso mostra que nas condições em que o estudo foi realizado, o tempo de maceração de 12 h foi suficiente para a extração dos compostos avaliados.

Avaliando-se os diferentes tratamentos (Tabela 2), os resultados apresentados mostraram que na extração assistida por ultrassom, o teor de compostos fenólicos foi

numericamente maior, comparado a extração por maceração. Embora não houve diferença significativa entre os compostos fenólicos nos diferentes tempos de ultrassom, o teor obtido em 30 min ($15,51 \mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ g massa seca) foi maior estatisticamente ($p<0,05$; $F_{\text{calc}}=275,62$) do valor obtido em 48 h no processo de maceração ($12,29\mu\text{g EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ g massa seca). O método de extração por ultrassom utiliza correntes de alta frequência, promove colapso e ruptura celular e aumenta a penetração do solvente, o que contribui em concentrações maiores de polifenóis e melhor atividade antioxidante, quando comparado com o método convencional de extração (Porto *et al.*, 2013; Braga, 2018; Ribeiro, 2011).

Em relação a extração por ultrassom, observou-se que a capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) foi significativamente maior ($p<0,05$) nas amostras com 30 min de extração, quando comparadas aos tempos de 10 e 20 min, indicando que o extrato foi mais eficaz contra os radicais DPPH e ABTS.

Observou-se também, que por apresentarem resultados semelhantes, ambos os métodos utilizados (DPPH e ABTS) foram adequados para determinar a capacidade antioxidante dos extratos da casca de pinhão. Alguns compostos que têm atividade de eliminação do radical ABTS podem não apresentar a mesma atividade em relação ao radical DPPH, baseado na ação de diferentes cátions para a reação com estes radicais. Estudos concluíram que os antioxidantes hidrofílicos e de alta pigmentação são melhores refletidos pelo ensaio ABTS, em relação ao método do DPPH, além de que diferentes métodos de análise do potencial antioxidante podem gerar diferentes resultados, visto que os compostos interagem de modos diferentes com cada substância (Gaber; El-Dahy; Shalaby, 2023).

Os resultados (Tabela 2) obtidos nos tratamentos com extratos aquosos de cascas de pinhão indicam que essa parte da araucária possui potencial antioxidante. De acordo com Sales *et al.* (2019) o potencial antioxidante de diferentes extratos de plantas é uma condição promissora para sua aplicação como agentes anticancerígenos, uma vez que possuem a capacidade de eliminar os radicais livres e, conseqüentemente, proteger as células de seus efeitos nocivos. Dessa forma é essencial entender a relação dos antioxidantes com a atividade antitumoral, pois estes potencializam os efeitos das drogas antineoplásicas, podendo, assim, diminuir a dose administrada desses medicamentos, sem prejudicar o efeito terapêutico, proporcionando a redução dos efeitos colaterais. Essa associação concomitante parece proteger as células sadias da ação das drogas, principalmente as dos tecidos de rápida proliferação celular (Santos; Souza, 2001; Weber, 2018).

Os valores da capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), obtidos em 30 min de extração por ultrassom ($1159,87\pm 7,63$ e $1202,44\pm 6,44 \mu\text{M TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$ g massa seca) foram

maiores ($p < 0,05$) quando comparados com o tempo de maceração de 48 h ($970,42 \pm 118,65$ e $942,80 \pm 31,42 \mu\text{M TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$ g massa seca, ($F_{\text{calc}}=7,80$; $F_{\text{cal}}=195,32$)). Como método alternativo de extração, o ultrassom destaca-se pela rapidez, redução de reagentes, além da qualidade do extrato. As vantagens deste tratamento estão na simplicidade do equipamento, redução da quantidade de reagentes, na possibilidade de usar diferentes solventes para a extração, bem como diminuir o tempo necessário para realizá-las (Schons *et al.*, 2017; Thoe *et al.*, 1998; Mulet *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2018; Leite *et al.*, 2021). Portanto, entre os tratamentos, o ultrassom (30 min) foi superior, indicando o tempo necessário para uma extração favorável, econômica e eficiente.

Em estudo realizado por Koehnlein *et al.* (2012), os autores avaliaram a capacidade antioxidante em extratos de casca de pinhão (70% etanol em água) e reportaram que 50% do radical foi eliminado. Segundo os autores, considerar a polaridade do solvente utilizado é um parâmetro importante, e quando se utiliza o método de extração aquoso, a água é o solvente mais adequado, uma vez que o processo de extração dos compostos fenólicos é facilitado, resultando em maiores concentrações na amostra.

Diante dos resultados obtidos, a condição de maior rendimento de extração (ultrassom 30 min) para a casca de pinhão *in natura* (*Araucaria angustifolia*) foi selecionada para as etapas seguintes de estudo.

4.4 PERFIL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO DA *Araucaria angustifolia* POR HPLC-MS

São muitas as técnicas utilizadas para a detecção de compostos fenólicos. Contudo, os compostos fenólicos são constituídos de estrutura muito similar, ocasionando espectros de UV semelhantes, dificultando a identificação dos compostos. A cromatografia líquida acoplada ao detector de massas permite identificar diferenças nas estruturas dos compostos de interesse (Sun *et al.*, 2007). O processo para demonstrar a especificidade do método depende do seu objetivo. Em diversas técnicas analíticas (como nas análises cromatográficas, por exemplo) esse parâmetro pode ser estabelecido pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições deve-se proceder à análise, seguida por outras técnicas comprobatórias (Brito *et al.*, 2003).

A partir das condições analíticas utilizadas para os padrões na análise cromatográfica, foi possível indicar a presença de compostos bioativos, por meio da comparação dos tempos

de retenção e espectros de absorção UV/VIS de padrões autênticos, utilizando a biblioteca de padrões no equipamento, permitindo assim, qualificar a amostra e constituir o perfil de compostos das cascas de pinhão do presente estudo. Não foi possível quantificar os compostos no extrato da casca de pinhão da amostra. A análise cromatográfica apresentou um limite de detecção (LOD mg/L) na faixa de 0,01 a 0,27 e limite de quantificação (LOQ mg/L) de 0,02 a 0,82 indicando a necessidade de método com limites de detecção na escala de micrograma por litro ($\mu\text{g/L}$).

A Tabela 3 apresenta os compostos fenólicos identificados no extrato da casca de pinhão obtido pela extração em ultrassom por 30 min.

Tabela 2 - Compostos Fenólicos identificados por HPLC-MS no extrato da casca de pinhão *in natura* obtido pelo método de extração em ultrassom por 30 min.

| Compostos Fenólicos | Tempo de retenção (min) | Precursor íon (m/z) |
|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Quercetina | 12,049 | 301,00 (-) |
| Epicatequina | 9,393 | 289,00 (-) |
| Ácido gálico | 8,406 | 169,00 (-) |
| Epigallocatequina | 9,206 | 305,00 (-) |

Fonte: Elaborada pela autora (2023); *: tempo de retenção em minutos; ** (m/z=massa/ carga elétrica).

Os compostos fenólicos (quercetina, epicatequina, ácido gálico e epigallocatequina) identificados no extrato da casca de pinhão, estão coerentes com valores obtidos em literatura. De acordo com Castrillon *et al.* (2021), observaram em estudo integral do pinhão, a presença expressiva de componentes fenólicos na casca, dentre eles ácido gálico, epicatequina, catequina, epigallocatequina, quercetina. Conforme Liu *et al.* (2017) a quercetina apresenta atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas, antivirais e antitumorais. Souza *et al.* (2019) apresentaram perfis de compostos fenólicos da casca da semente *Araucaria angustifolia* e identificaram flavonoides (quercetina e apigenina) e taninos (catequina e epicatequina), sendo que esses últimos possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, bem como potencial anticarcinogênico e antimutagênico. A casca do pinhão brasileiro não é consumida como alimento e é descartada como um resíduo, indicando que sua utilização pode ser promissora levando-se em consideração a presença de compostos fenólicos.

À luz destas considerações, os resultados alcançados sobre a determinação qualitativa de compostos polifenólicos e flavonoides na *Araucaria angustifolia* apoiam o uso deste resíduo como componente bioativo. Entretanto, se faz necessário a identificação desses compostos e de suas estruturas químicas por outros métodos espectroscópicos com modificações para isolamento efetivo de cada composto.

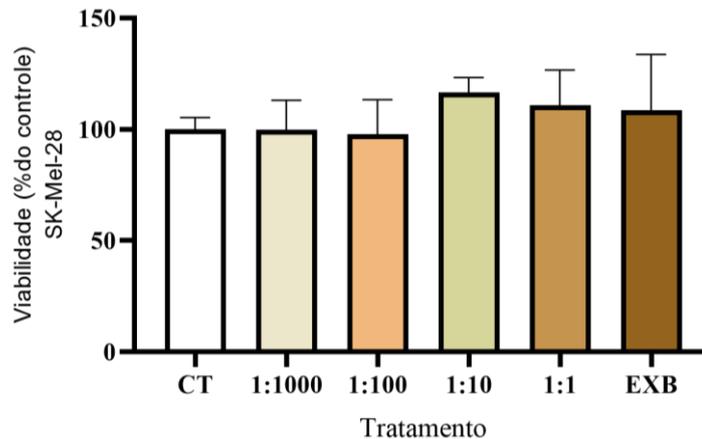
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS

Nesta etapa avaliou-se a atividade antitumoral do extrato aquoso da casca de pinhão *in natura* obtido pela extração assistida por ultrassom durante 30 min. Este extrato foi escolhido por apresentar resultado significativo em relação a capacidade antioxidante quando comparado aos demais. Nesta avaliação foi investigada a capacidade do extrato em inibir o crescimento celular tumoral, verificando a citotoxicidade do extrato sobre as células avaliadas.

Os compostos bioativos obtidos a partir de fontes vegetais tem ganhado destaque na área da saúde devido aos benefícios pelos efeitos químicos e biológicos (Souza *et al.*, 2014). Milhares de fitoquímicos que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais e antialérgicas estão presentes em frutas e vegetais. Análises *in vivo* e *in vitro*, bem como estudos em humanos, sugeriram que os polifenóis têm efeitos protetores contra doenças (Pop; Diaconeasa, 2021).

O extrato aquoso da casca de pinhão *in natura* na linhagem SK-Mel-28 não apresentou atividade sobre a viabilidade das células quando comparada com o controle após 24 h de tratamento. Conforme observado na (Figura 6), os resultados mostraram que o extrato diluído nas concentrações 1:1000 e 1:100, não apresentou toxidez significativa nos tratamentos. Observou-se que o extrato diluído nas concentrações 1:10, 1:1 e extrato bruto estimulou a proliferação celular quando comparados com o grupo controle. Esse fato pode ser devido à ausência ou às baixas concentrações de compostos capazes de desempenhar propriedades antitumorais para determinada linhagem celular, ou ao método de extração, mesmo tendo atividade antioxidante significativa, pode não ter efetivamente recuperado compostos com essas propriedades de suas fontes (cascas de pinhões *in natura*), o que justificaria a necessidade de mais análises detalhadamente sobre cada composto bioativo presente no extrato.

Figura 6- Viabilidade de células de melanoma humano in vitro SK-Mel-28 tratadas através de diluição seriada com extrato de casca de pinhão in natura por 24h e avaliadas pelo método MTT*



Legenda: CT: Controle; EXB: Extrato Bruto; EAC: extrato diluição seriada; ns ($p > 0,05$); Dados apresentados como média \pm desvio padrão EAC quando comparado ao Controle.

É provável que a viabilidade celular e a atividade antiproliferativa sejam dependentes de diferentes tipos de compostos fenólicos. Sugere-se a continuidade da avaliação deste extrato, utilizando uma série de concentrações a fim de identificar os possíveis efeitos antiproliferativos e mecanismos de ação envolvidos dentro do processo da oncogênese (Weber, 2018).

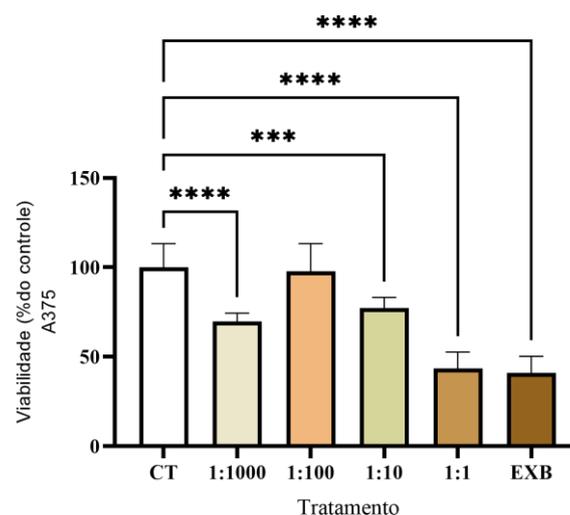
De acordo com Kato *et al.* (2021) avaliaram o efeito de extratos e frações de diferentes plantas brasileiras sobre a viabilidade de linhagens de células de melanoma SK-Mel-28 e SK-Mel-103, escolhidas por apresentarem elevada resistência e capacidade metastática. Os autores avaliaram que compostos bioativos dos extratos, estão positivamente correlacionados com a inibição das linhagens celulares resistentes, elencando esses compostos como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de melanoma. No mesmo estudo, os autores observaram que as frações obtidas a partir de solventes de média e baixa polaridade (compostas por polifenóis e derivados de terpenos) foram mais ativas do que as frações obtidas a partir de solventes de alta polaridade (compostas por metabólitos secundários ligados a glicosídeos ou grupos com grande quantidade de hidroxilas). Esses compostos mais polares podem ter baixa interação com a membrana plasmática, diminuindo os efeitos nas células tumorais, contudo, os autores destacam que ensaios in vitro não mimetizam um sistema biológico completo, portanto, os compostos não sofrem todos os processos farmacocinéticos e podem ter diferentes respostas nas células.

Conforme Zeng *et al.* (2014) avaliaram a viabilidade de células SK-Mel-28 tratadas com composto bioativo suprimindo cerca de 30% da proliferação das células tumorais após 48

e 72 h de tratamento, porém nenhum efeito significativo foi observado, portanto, é importante investigar novos agentes terapêuticos, que possam apresentar propriedades seletivas para induzir citotoxicidade através da ativação de vias de sinalização de morte celular (Branco *et al.*, 2015). Apesar de não ser possível estabelecer uma relação direta da citotoxicidade do extrato em células SK-Mel-28 nos resultados deste trabalho, uma vez que os testes são realizados em diferentes condições, é importante que sejam relatados, porém, não conclusivos, para próximos estudos do potencial tóxico do extrato da casca de pinhão *in natura* em células tumorais, visando um possível componente colaborativo na estratégia para aumentar a eficiência terapêutica de quimioterápicos em melanomas resistentes.

Diferentemente dos resultados anteriores, os tratamentos com extrato aquoso da casca de pinhão *in natura* induziram uma atividade antiproliferativa em células de melanoma humano *in vitro* A-375 (Figura 7). Os resultados mostraram diminuição significativa da viabilidade celular apresentando atividade antitumoral nas concentrações testadas ($p < 0,001$); ($p < 0,0001$), quando comparado ao controle, exceto no extrato diluído na concentração 1:100, onde as células tratadas não sofreram alteração quando comparadas ao controle. Os extratos diluídos nas concentrações 1:1000 e 1:10 foram capazes de inibir crescimento de células tumorais em aproximadamente 30 % em 24 h de tratamento.

Figura 7 - Viabilidade de células de melanoma humano *in vitro* A-375 tratadas através de diluição seriada com extrato de casca de pinhão *in natura*



Legenda: CT: Controle; EXB: Extrato Bruto; EAC: extrato diluição seriada; * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$); ns ($p > 0,05$); Dados apresentados como média \pm desvio padrão EAC quando comparado ao Controle.

Um estudo do polifenóis em uvas tintas, vinho tinto, amendoim e pinho (Niles *et al.*, 2003; Horn; Zamin *et al.*, 2017; Oz *et al.*, 2019) confirmaram a atuação de fitoquímicos em diversas vias de sinalização celular e potencial anti-inflamatório sendo que inibiu o crescimento e induziu apoptose em linhagens de células de melanoma humano A-375 e SK-Mel-28, sendo a linhagem A-375 mais sensível à indução de apoptose do que a linhagem melanótica SK-Mel-28. A linhagem A-375 avaliada no presente estudo correspondeu ao extrato de forma expressiva possivelmente pelas características indicativas dos polifenóis, através de vias de sinalização responsáveis pela regulação do funcionamento das células (Viana *et al.*, 2017).

As células necessitam se comunicar umas com as outras e, a partir desta comunicação, coordenar as funções desempenhadas por cada tipo celular. O princípio da sinalização celular, se caracteriza pela comunicação através de moléculas-sinal, secretadas ou expostas em sua superfície. As moléculas-sinal são reconhecidas por receptores, geralmente proteínas que podem estar expostas na superfície celular ou presentes no interior das células, comprometidas com a regulação de eventos da fisiologia celular, como proliferação, migração, diferenciação celular (Viana *et al.*, 2017).

De acordo com Wu *et al.* (2015), linhagens de melanoma humano A-375 e SK-Mel-31, avaliadas, no tratamento com fitoquímico induziu parada no ciclo celular e inibiu a proliferação destas células, evidenciando o papel desses compostos na atuação promissora de ação para o bloqueio de crescimento celular. Em virtude de o câncer apresentar, muitas vezes, resistência às formas tradicionais de tratamento e/ou estas não serem seletivas à neoplasia, apresentando diversos efeitos colaterais, surge a necessidade de formas alternativas, as quais visam, sobretudo, maior especificidade dos mecanismos de ação, segurança e eficácia terapêutica, defende-se a maior utilização de produtos naturais bioativos, por apresentarem compostos ativos citotóxicos e indutores de apoptose em várias linhagens de células tumorais testadas (Viana *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, a apoptose tem atraído muita atenção com potencial de aplicação em várias doenças humanas. Para a manutenção normal do organismo completo, milhões de células serão sintetizadas e morrem todos os dias, e a morte celular relacionada à apoptose é essencial para o crescimento saudável de um organismo. Desta forma, o estudo da via de sinalização de apoptose aumentaria o entendimento sobre os mecanismos apoptóticos de uma droga alvo que abriria caminho para a descoberta de novos fármacos (Perumalsamy *et al.*, 2018).

Em estudo para investigar o perfil de segurança *in vitro* e *in vivo* de um extrato aquoso de *M. officinalis*, Sipos *et al.* (2021) observaram efeito citotóxico seletivo em células A-375 em concentração mais altas (1000 µg/mL) enquanto nenhuma toxicidade foi observada em células normais HaCaT (queratinócitos). No presente estudo foi indicado o potencial citotóxico em concentração mais elevada (Figura 7), porém, se faz necessário estudos futuros para avaliar a citotoxicidade em células não tumorais. Deve-se salientar para que um composto tenha um potencial antitumoral ideal é necessário que ele possua efeitos citotóxicos contra as células tumorais, mas que não apresente esse mesmo efeito em células normais, ou que esse efeito seja muito reduzido, possuindo assim um efeito contra as células do câncer e baixa toxicidade ao organismo (Mulder *et al.*, 2013; Huang, *et al.*, 2014).

5 CONCLUSÃO

Diante dos tratamentos realizados, conclui-se que *Araucaria angustifolia* apresentou teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante nos diferentes métodos de extração realizados. Para compostos fenólicos totais não houve resultados significativos entre métodos da extração pela maceração e ultrassom. Em relação aos métodos para a avaliação da atividade antioxidante, os resultados mais relevantes foram para o método ABTS através da extração assistida por ultrassom durante 30 minutos em comparação com DPPH. Isso ressalta a importância da realização de diferentes metodologias, vistos que os compostos bioativos podem atuar de diferentes formas. É importante destacar o uso de água como solvente para as extrações, obtendo extratos com resultados promissores e que podem ser utilizados em áreas nutraceuticas e indústria farmacêutica, sem a presença de resíduos de solventes orgânicos.

Quanto a avaliação da atividade antitumoral, o extrato escolhido não demonstrou resultados para o tratamento de células de melanoma cutâneo na linhagem SK-Mel-28 indicando ausência ou baixa concentração de compostos bioativos capazes de desempenhar propriedades no combate as células tumorais com maior resistência.

Para a linhagem celular A-375 os tratamentos apresentaram resultados significativos na redução da viabilidade celular, destacando-se os extratos diluídos nas concentrações 1:1000, 1:10, 1:1 e extrato bruto, quando comparados ao controle, de forma dose-dependente nesses tratamentos, indicando a atuação dos compostos bioativos como coadjuvantes no tratamento de doenças tumorais.

Até o presente momento, não foi encontrada na literatura estudos avaliando o potencial do extrato aquoso da casca do pinhão *in natura* (*Araucaria angustifolia*) em células de melanoma cutâneo nas linhagens analisadas no presente trabalho.

Este trabalho sugere que quercetina, epicatequina, ácido gálico e epigallocatequina sejam responsáveis pela atividade antitumoral do extrato *Araucaria angustifolia*. Contudo, é necessário avaliar o potencial dos compostos identificados individualmente. Esta pesquisa demonstra potencial de continuidade, necessitando aprofundamentos em relação aos mecanismos envolvidos nos tratamentos e aos compostos que de fato estão contribuindo para inibir a migração celular da linhagem A-375, além de oportunizar campo para o desenvolvimento de novos fármacos com menor efeito no organismo humano.

Considerando-se o potencial da casca, um material geralmente descartado, e outras partes do pinhão, torna-se altamente viáveis e aplicáveis, estudos baseados na extração de substâncias provenientes deste material vegetal, considerado como resíduo bioativo.

6 REFERÊNCIAS

ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, p. 398-406, 2013.

ALBUQUERQUE, E. R.; GOSSLER, S. C.; PIOVEZAN, M.; CONTO, L. C. **Extração e Determinação de Flavonóides, Taninos Condensados e Totais da casca do pinhão (*Araucaria angustifolia*)**. Instituto Federal de Santa Catarina. Lages-SC. 2017. Disponível em: <<https://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TCC%20II/TCC%202017%201/Eduarda%20e%20Sheili.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHRAF, G. M.; KAMAL, M. A.; ANSARI, S. A.; DAMANHOURI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; SHEIKH, I. A. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, v. 32, p. 2999-3005, 2012.

ARAÚJO, L. F.; GUIOTOKU, M. Casca de pinhão: uma alternativa para obtenção de carvão vegetal. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 2010, Curitiba. Química: contribuições para o futuro. **Anais...** Curitiba: SBQ, 2010.

ARRUDA, H. S. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738-749, 2018.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BASTOS, R. G. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae)**. 2016. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

BATISTA, R. A. **Produção e avaliação sensorial de cerveja com pinhão (*Araucaria angustifolia*)**. 2014. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) -Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BELLO-PÉREZ, L. A.; GARCÍA-SUÁREZ, F. J.; MÉNDEZ-MONTEALVO, G.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A novel starch for application in food industry. **Starch**, v. 58, n. 6, p. 283–291, 2006.

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132–141, 2010.

BETA, T.; DUODU, K. G. Bioactive: antioxidants. **Reference Module in Food Science**, v. 86, p. 76-86, 2016.

BRAGA, L. P. **Efeito de diferentes métodos de extração sobre a qualidade de compostos bioativos em óleo extraído de semente de araticum**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007, Seção 1.

BRANCO, C. S.; de LIMA, E. D.; PAVÃO, E.; BERTHOLDO-VARGAS, N. M. B. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze induces oxidative and genotoxic damage in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae). **International Journal of Pest Management**, v.60, p.114-120, 2014. <https://doi.org/10.1080/09670874.2014.934408>.

BRANCO, C. D. S.; LIMA, E. D.; RODRIGUES, T. S.; Scheffel, T. B.; Scola, G.; Laurino, C. C.; Moura, S.; Salvador, M. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEp-2 cancer cells. **Chemic Biological Interactions**, v. 231, p. 108–118, 2015.

BRANCO, C. D. S.; RODRIGUES, T. S.; LIMA, E. D.; SALVADOR M. Polyphenols-rich extract from *Araucaria angustifolia*: differential mechanisms on cancer and normal cells. **Cancer Cell & Microenvironment**, v. 2, p. 1-5, 2015.

BRAY, F.; FERLAY, C.C.; SOERJOMATARM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BOLLING, B.; CHEN, C.; MCKAY, D.; BLUMBERG, J. Fitoquímicos de nozes: composição, capacidade antioxidante, bioatividade, fatores de impacto. Uma revisão sistemática de amêndoas, Brasil, castanha de caju, avelãs, macadâmias, nozes, pinhões, pistache e nozes. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, p. 244-275, 2011.

BONILLA, J; VARGAS, F. C.; OLIVEIRA, T. G.; MAKISHI, G. L. A.; SOBRAL, P. J. A. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 1-7, 2015.

BORGES, C. E. F.; BUCEK, E. U.; FINZER, J. R.; COSTA, M. G. Influência do tamanho da partícula e da agitação na extração de solúveis. In: XXXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, 2017, Maringá. **Anais...** Maringá, 2017. Disponível em: <<https://proceedings.science/enemp/enemp-2017/trabalhos/influencia-do-tamanho-da-particula-e-da-agitacao-na-extracao-de-soluveis?lang=pt-br>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários de Plantas. **Revista Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes em Subprodutos do Pseudofruto de Caju (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science Technology**, v. 27, p. 902-908, 2007.

BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 236-242, 2007.

CARDOSO, W. A.; ALMEIDA, W.B.; GEREMIAS, R.; PUCKOSKI, A.G.; ANGIOLETTO, E. Comparação entre métodos de extração de óleo de microalgas. **Revista Iniciação Científica**, v.12, p.1-12, 2014.

CARVALHO, M. M. X. D. **Uma Grande Empresa em Meio a Floresta: A História da Devastação da Floresta com Araucária e a Southern Brazil Lumber and Colonization (1870-**

1970). 2010, 300p. Tese (Doutorado em História) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

CASON, C.; YEMMIREDDY, V. K.; MOREIRA, J.; ADHIKARI, A. Antioxidant Properties of Pecan Shell Bioactive Components of Different Cultivars and Extraction Methods. **Foods**, v.10, n. 4, p. 713, 2021.

CASTRILLON, R.; HELM, C.V.; MATHIAS, A.L. In: Eventos Araucária: pesquisa, inovação e tecnologias para sistemas de produção. Erva-mate XXI: inovação e tecnologias para o setor ervateiro, 2020, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2021. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1132940>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

CHEMAT, F.; ROUMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; TIXIER, A. S. F.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.168, 1998.

CLADERA-OLIVERA, F. **Estudos tecnológicos e de engenharia para o armazenamento e processamento do pinhão**. 2008. 200 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F.; NOREÑA, C. P. Z.; PETTERMANN, A. C., MARCZAK, L. D. F. Influence of cooking in sorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). **Latin American Applied Research**, v.42, n.1, p.11-18, 2012. Disponível em:< <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/81604> >. Acesso em: 14 jun. 2023.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Comparative study of the starch digestibility of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seed flour. **Starch**, v. 60, p. 192-198, 2008.

CORDENUNSI, B. R.; MENEZES, E. W.; GENOVESA, M. I.; COLLI, C.; SOUZA, A. G.; LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.11, p.3412-3416, 2004.

CORRÊA, M. de F.; HELM, C. V. Caracterização da composição nutricional do pinhão *in natura* e cozido (*Araucaria angustifolia*). 2010. In: IX EVINCI - Evento de Iniciação Científica da UniBrasil. Colombo - PR, **Anais...** Colombo. Embrapa Florestas, 2010.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; Souza, C. R. F.; Oliveira, W. P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. **Journal of Food Engineering**, v. 127, p. 34-42, 2014.

COSTA, A.; HELM, C.; TAVARES, L. B. Obtenção e caracterização de farinha de endosperma e de casca de pinhão para fins alimentícios. In: XI Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas, 11, 2012, Colombo, Paraná. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2012.

COSTA, J. P.; CARVALHAIS, V.; AMADO, F.; SILVA, A.; NOGUEIRA-FERREIRA, R.; FERREIRA, R.; HELGUERO, L.; VITORINO, R. Anti-tumoral activity of human salivary peptides. **Peptides Science**, v.71, p. 170-178, 2015.

COSTA-LOFUTO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p. 47-58, 2010.

CUJIC, N.; SAVIKIN, K.; JANKOVIC, T.; PLJEVLJAKUSIC, D.; ZDUNIC, G.; IBRIC, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135-142, 2016.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v.1, n.2, p.175-181, 2016.

DAUDT, R. M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; THYS, R. C. S. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, 2014.

DAUDT, R. M.; BACK, P. I.; CARDOZO, S. M.; MARCZAC, L. D. F.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 573-580, 2015.

DAUDT, R. M.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; WILLIAMS, T.; WOOD, D. F.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; MARCZAC, L. D. F.; MCHUGHB, T. H. Comparative study on properties of edible films based on pinhão (*Araucaria angustifolia*) starch and flour. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 279–287, 2016.

DAUDT, R. M. **Aplicação dos componentes do pinhão no desenvolvimento de produtos inovadores nas indústrias cosmética e de alimentos**. 2016. 198 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33- 40, 2004.

DE LIMA, T. A. D. M.; DE LIMA, G. G.; CHEE, B. S.; HENN, J. G.; CORTESE, Y. J.; MATOS, M.; HELM, C. V.; MAGALHÃES, W. L. E.; NUGENT, M. J. D. Characterization of Gels and Films Produced from Pinhão Seed Coat Nanocellulose as a Potential Use for Wound Healing Dressings and Screening of Its Compounds towards Antitumour Effects. **Polymers**, v. 14, p. 2776, 2022.

DORIGAN DE MATOS FURLANETTO, A. L.; VALENTE, C.; MARTINEZ, G. R.; MERLIN-ROCHA, M. E.; MAURER, J. B. B.; CADENA, S. M. S. C. Cold stress on *Araucaria angustifolia* embryogenic cells results in oxidative stress and induces adaptation: implications for conservation and propagation. **Free Radical Research**, v. 53, p. 45-56, 2019.

DORS, G. C.; HEIDTMANN PINTO, R.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 219-224, 2009.

FONSECA, L. M.; OLIVEIRA, J. P.; CRIZEL, R. L. Fibras de Amido Eletrofiadas Carregadas com Extrato de Pelagem de Pinhão (*Araucaria angustifolia*) Rico em Compostos Fenólicos. **Food Biophysics**, v. 15, p. 355-367, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1007/s11483-020-09629-9>>. Acesso em: 28 mai. 2022.

FONSECA, L. M.; SILVA, F. T.; BONA, N. P.; STEFANELLO, F. M.; BORGES, C. D.; DIAS, A. R. G.; DA R. E. Aerogéis de Amidos de Milho Nativos e Aniônicos Carregados com Extrato de Cobertura de Pinhão (*Araucaria angustifolia*): Atividade Antitumoral em Células de Glioma de Rato C6 e Digestibilidade In Vitro. **Starch**, v.72, 2020. Disponível em:<<https://doi-org.ez372.periodicos.capes.gov.br/10.1002/star.201900280>>. Acesso em: 20 mai. 2022.

FREITAS, S. P.; FREITAS-SILVA O.; MIRANDA, I. C.; COELHO, M. A. S. Extração e fracionamento simultâneo de óleo castanha-do-brasil com etanol. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p.14-17, 2007.

FREITAS, T. B.; SANTOS, C. H. K.; SILVA, M. V.; SHIRAIB, M. A.; DIASC, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; ISABEL C. F. R.; FERREIRA, O. H. G.; LEIMANN, F.V.

Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 28-34, 2018.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B.T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Europe Journal Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.

GABER, N. B.; EL-DAHY, S. I.; SHALABY, E. A. Comparison of ABTS, DPPH, permanganate, and methylene blue assays for determining antioxidant potential of successive extracts from pomegranate and guava residues. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 4011–4020, 2023.

GAMA, T. M. M. T. B. **Estudo Comparativo dos Aspectos Físico-Químicos do Pinhão Nativo e do Pinhão Proveniente de Processos de Polinização Controlada de *Araucaria angustifolia* e da Influência do Tratamento Térmico**. 2006. 90p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITALL, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **BioMed Research International**, p. 23, 2014.

GIL-CHÁVEZ, G. J.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; BASILIO HEREDIA, J.; SEPUCEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUIAR, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Reviews In Food Science And Food Safety**, v.12, n.1, p.5–23, 2013.

GIZIR, A. M.; TURKER, N.; ARTUVAN, E. Pressurized acidified water extraction of black carrot (*Daucus carota* ssp. sativus var. atropurpureus Alef.) anthocyanins. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 363-370, 2008.

GODOY, R. C. B. de; DELIZA, R.; NEGRE, M. de F. de O.; SANTOS, G. G. dos. Consumidor de pinhão: hábitos, atributos de importância e percepção. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 38, p. 8, 2018.

GODOY, R. C. B. de; CARVALHO, C. W. P. de; GUIDOLIN, M. E. B. Z.; IKEDA, M.; NOGUEIRA, R. I.; HELM, C. V.; CORNEJO, F. E. P.; COSTA, F. J. O. G. **Araucária: pesquisa e desenvolvimento no Brasil**. Brasília: Embrapa, cap. 16, p. 321-336, 2021.

GUIDOLIN, R. C. S. T. **Caracterização da estrutura fina do amido de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze (pinhão) e produção de extrusados**. 2016. 160f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

HEBERLE, A. F.; SOARES, T. R.; HELM, C. V. Caracterização da composição química, minerais e perfil de ácidos graxos em amostras de pinhão: safra 2014. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 14, 2015, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2015. p. 26-27.

HELT, K. M. P.; NAVAS, R.; GONÇALVES, E. M. Características físico-químicas e compostos antioxidantes de frutos de pitanga da região de Capão Bonito – SP. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 16, p. 96-102, 2018.

HENRÍQUEZ, C.; ESCOBAR, B.; FIGUEROLA, F.; CHIFFELLE, I.; SPEISKY, H.; ESTÉVEZ, A. M. Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 592-601, 2008.

HORN, F. M.; ZAMIN, L. L. O potencial do resveratrol como quimioterápico para o câncer de pele: uma revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 2, p. 210-216, 2017.

HUANG, R.; ZHAO, L.; CHEN, H.; YIN, R. H.; LI, C. Y.; ZHAN, Y. Q.; ZHANG, J. H.; GE, C. H.; YU, M.; YANG, X. M. Megakaryocytic differentiation of K562 cells induced by PMA reduced the activity of respiratory chain complex IV. **PloS one**, v. 9, n. 5, 2014.

IARC. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 27 jun. 2023.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 1. ed. dig. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA **Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2022**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao>>. Acesso em 30 mar. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Como surge o câncer**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>>. Acesso em 26 jun. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estatísticas de câncer.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>> Acesso em: 29 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Números e estimativas.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao>>. Acesso em 30 mar. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é o câncer.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 26 jun. 2023.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em :<<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 15 ago. 2023.

JACINTO, R.C.; BRAND, M. A.; RIOS, P. S.; CUNHA, A. B.; ALLEGRETTI, G. L. Análise da qualidade energética da falha de pinhão para a produção de briquetes. **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 112, p. 821-829, 2016.

JENSEN, S.; ZANOELO, E. F. Kinetics of aqueous extraction of mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v.36, n. 2, p. 220-227, 2013.

KARAKAYA. S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 66, 2004.

KATO, N. N.; STAVIS, V. K.; BOARETTO, A. G.; CASTRO, D. T. H.; ALVES, F. M.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E. L.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C.A. Application of the metabolomics approach to the discovery of active compounds from Brazilian trees against resistant human melanoma cells. **Phytochemical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 992-1002, 2021.

KAULMANN, A.; JONVILLE, M. C.; SCHNEIDER, Y. J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 155, p. 240-250, 2014.

KOBAYASHI, B. F.; AMARAL, D. R. Efeito de extratos vegetais de plantas do Cerrado para controle de pinta-preta em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 189-192, 2018.

KOEHNLEIN, E. A.; CARVAJAL, A. E. S.; KOEHNLEIN, E. M.; COELHO-MOREIRA J. S.; INÁCIO, F. D.; CASTOLDI, R. Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Raw and Cooked Brazilian Pinhão (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, n. 21, p. 512-518, 2012.

KLUCZKOVSKI, A. M.; OLIVEIRA, L. B.; MACIEL, B. J.; KLUCZKOVSKI -JUNIOR, A. Caracterização e extração do óleo de castanha-do-Brasil: revisão. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 391-402, 2021.

KOTOVICZ, V.; WYPYCH, F.; ZANOELO, E. F. Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): Experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 1-9, 2014.

KOTOVICZ, V.; LENEICKER, R.; BARBOSA, M. P.; KRÜGER, R. L.; BOMBARDELLI, M. C. M. Avaliação da atividade antioxidante de extratos de casca de Banana Nanica obtidos por maceração. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, p. 269-275, 2021. Disponível em: <<https://www.proquest.com/openview/b22347cd5a32ae45560e404ff004e424/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2032621>>. Acesso em: 2 ago. 2022.

LEITE, P. I. P.; BARRETO, S. M.; FREITAS, P. R.; DE ARAÚJO, A. C.; PAULO, C. L.; DE ALMEIDA, R. S.; ASSIS, C. F.; PADILHA, C. E. A.; FERRARI, M.; SOUSA JUNIOR, F. C. Extraction of bioactive compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) fruit by eco-friendly solvents: Chemical and functional characterization. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 22, p. 481-489, 2021.

LEIVAS, C.; WASZCZYNSKYJ, N.; GODOY, R.; HELM, C. Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 172-177, 2013.

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). **Revista Brasileira De Plantas Mediciniais**, v. 15, n.3, p. 415-422, 2013.

LINARES, A. R.; HASE, S. L.; VERGARA, M. L.; RESNIK, S. L. Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: influence of temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 471-477, 2010.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004.

LIU, Y.; TANG, Z. G.; LIN, Y.; QU, X. G.; LV, W.; WANG G. B.; LI, C. L. Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.92, p.33–38, 2017.

LO, C.; LAI, T. Y.; YANG, J. S.; MA, Y. S.; WENG, S. W.; LIN, H.Y.; CHEN, H.Y.; LIN, J. G.; CHUNG, J.G. Gallic acid inhibits the migration and invasion of A375.S2 human melanoma cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and Ras. **Melanoma Research**, v. 21, n. 4, p. 267-273, 2011.

LU, J. J.; BAO, J. L.; WU, G. S.; XU, W. S.; HUANG, M. Q.; CHEN, X. P.; WANG, Y. T. Quinones Derived from Plant Secondary Metabolites as Anti-cancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 456-463, 2013.

MAJRASHI, T. A.; ALSHEHRI, S. A.; ALSAYARI, A.; MUHSINAH, A. B.; ALROUJI, M.; ALSHAHRANI, A. M.; SHAMSI, A.; ATIYA, A. Insight sobre os papéis biológicos e mecanismos de fitoquímicos em diferentes tipos de câncer: visando a terapêutica do câncer. **Nutrientes**, v. 15, p. 1704, 2023.

MALTA, D. S.; HELM, C. V.; JORGE, R. M. M.; MATHIAS, A. L. **Composição nutricional da amêndoa do pinhão da *Araucaria angustifolia* de seis localidades do sul brasileiro**. Colombo: Embrapa Florestas, 2021. 34 p.

MAKSIMOVIC, S.; JASNA, I.; SKALA, D. Supercritical extraction of essential oil from *Mentha* and mathematical modelling- the influence of plant particle size. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1767-1777, 2012.

MARCIC, C.; LESPE, G.; POTIN-GAUTIER, M. Pressurised solvent extraction for organotin speciation in vegetable matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1574-1583, 2005.

MIZGIER, P.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKOL-LETOWSKA, A.; KOLNIAK-OSTEK, J.; KIDON, M.; FECKA, I. Characterization of phenolic compounds and antioxidant and antiinflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. **Journal Functional Foods**, v. 21, p.133-146, 2016.

MOTA, G. S. T.; ARANTES, A. B.; SACCHETTI, G.; SPAGNOLETTI, A.; ZIOSI, P.; SCALAMBRA, E.; VERTUANI, S.; MANFREDINI, S. Antioxidant activity of cosmetic formulations based on novel extracts from seeds of brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertoll) kuntze. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, p. 190-202, 2014.

MUCCILLO, M. E. B. Z. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**. 2009. 156 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MULET, A.; BENEDITO J.; GOLAS, Y.; CARCEL, J.A. Noninvasive ultrasonic measurements in the food industry. **Food Reviews International**, v.18, p. 123-133, 2002.

NAVIGLIO, D.; FERRARA, L. **Tecniche estrattive solido-liquido: Teoria e pratica**. Aracne: Roma, 2008. 100 p.

NAVIGLIO, D.; PIZZOLONGO, F.; ROMANO, R.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, B.; SANTINI, A. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the Naviglio extractor for the production of lemon liquor. **African Journal of Food Science**, v. 1, p. 42-50, 2007.

NILES, R. M.; McFarland, M.; Weimer, M. B.; Redkar, A.; Fu, Y. M.; Meadows, G. G. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 190, n. 2, p. 157-163, 2003.

NÓBREGA, J. V. S.; LIMA, A. G. B.; MELO, G. B. C. A.; CARMONA, C. U. M.; CABRAL NETO, J. Estudo da absorção de água em compósitos com fibras vegetais: uma prática de gestão ambiental. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 9, p. 294-310, 2021.

OGAH, O.; WATKINS, C. S.; UBI, B. E.; ORAGUZIE, N. C. Phenolic compounds in rosaceae fruit and nut crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9369-9386, 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501574q>>. Acesso em: 06 dez. 2021.

OLDONI, T. L. C.; MERLIN, N.; BICAS, T. C.; PRASNIEWSKI, A.; CARPES, S. T.; ASCARI, J.; DE ALENCAR, S. M.; MASSAROLI, A. P.; BAGATINI, M. D.; MORALES, R.; THOMÉ, G. Antihyperglycemic activity of crude extract and isolation of phenolic compounds with antioxidant activity from *Moringa oleifera* Lam. leaves grown in Southern Brazil. **Food Research Internacional**, v.141, p. 82-110, 2021.

OLIVEIRA, A. de. **Avaliação da bioatividade de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. 2019. 46 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2019.

OLIVEIRA, I. S. T. de. **Extratos aquosos de folhas secas e frescas de moringa sob parâmetros de fermentação ruminal in vitro**. 2021. 72p. Dissertação (Mestrado em

Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2021.

OLIVEIRA, R. O.; GONÇALVES G. A.; DORNELES F. I.; KOEHNLEIN E. A.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA R. M. Inhibition of pancreatic lipase and triacylglycerol intestinal absorption by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Nutrients**, v. 7, p. 5601- 5614, 2015.

OLIVEIRA, R. S.; SILVA, W. M.; PRATI, W. J.; RUFINO, P. C. H.; SANTANA, R. P. V. F.; BASSOLI, B. K.; SILVA, F. C. Quimiopreventive Action of Phytochemicals through Regulation of Transcription Factor Nrf2: Integrative Literature Review. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 66, p. 1-11, 2020.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.18, p. 230-239, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Tecnologias de conservação aplicadas à segurança de alimentos**. Washington, D.C.: OPAS, 2019. 84 p. Disponível em:< <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51502>>. Acesso em:30 de março de 2023.

OZ, B.; YILDIRIM, A.; YOLBAS, S.; CELIK, Z. B.; ETEM, E. O.; DENIZ, G.; AKIN, M.; AKAR, Z. A.; KARATAS, A.; KOCA, S. S. Resveratrol inhibits Src tyrosine kinase, STAT3, and Wnt signaling pathway in collagen induced arthritis model. **Biofactors**, v. 45, p. 69-74, 2019.

PELINSON, L. P.; ASSMANN, C. E.; PALMA, T. V.; CRUZ, I. B. M. da; PILLAT, M. M.; MÂNICA, A.; STEFANELLO, N.; WEIS, G. C. C.; ALVES, A. O.; ANDRADE, C. M.; ULRICH, H.; MORSCH, V. M. M.; SCHETINGER, M. R. C.; BAGATINI, M. D. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 2085-2092, 2019.

PERALTA, R. M.; KOEHNLEIN, E. A.; OLIVEIRA, R. F.; CORREA, V. G.; CORRÊA, R. C. G.; BERTONHA, L.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 85–93, 2016.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4 p. 146-152. 2012.

PERSIC, M.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SLATNAR, A.; VEBERIC, R. Chemical composition of apple fruit, juice and pomace and the correlation between phenolic content, enzymatic activity and browning. **Food Science and Technology**, v. 82, p. 23-31, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817302360?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 dez. 2021.

PERUMALSAMY, H.; SANKARAPANDIAN, K.; VEERAPPAN, K.; NATARAJAN, S.; KANDASWAMY, N.; THANGAVELU, L.; BALUSAMY, S. R. In silico and in vitro analysis of coumarin derivative induced anticancer effects by undergoing intrinsic pathway mediated apoptosis in human stomach cancer. **Phytomedicine**, v. 46, p. 119-130, 2018.

POP, T. D.; DIACONEASA Z. Recent Advances in Phenolic Metabolites and Skin Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, p. 1-24, 2021.

PORTO, C. da.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076–1080, 2013.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J.; TIWARY, A. K. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1113–1120, 2012.

RASCHEN, M. R.; LUCION, F. B.; CICHOSKI, A. J.; MENEZES, C. R. D.; WAGNER, R.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S. Determination of grain moisture content using microwave radiation. **Ciência Rural**, v. 44, p. 925-930, 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS+ radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231-1237, 1999.

REIS, J. D. E.; GOMES, P. W. P.; MURIBECA, A. de J. B.; CASTRO, M. N. R. de. Quantification of phenolic derivatives and antioxidant activity of the leaves of *Chamaecrista diphylla* (L.) Greene (Fabaceae). **Scientia Plena**, v. 16, n. 3, p. 1-9, 2020.

REIS, N. N. **Avaliação dos parâmetros físico-químicos e tecnológicos para obtenção de farinha de pinhão**. 2019. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2020.

RIBEIRO, M. V. S.; LIMA, A. R. N.; OLIVEIRA, T. K. B. Physical and chemical evaluation of the vegetable extract of the seed of *Cucurbita moschata*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, 2020.

RIBEIRO, T. P. **Maturação, qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de uvas americanas e dos sucos elaborados no Submédio do Vale do São Francisco**. 2011. 141 p. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J. M. D.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 981-991, 2010.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉ, R.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from Moringa oleifera Lam leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 246-254, 2015.

SALES, L. R. **Potencial antioxidante e antifúngico de extratos de bráctea e semente de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze**. 2019. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/204505>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SALLAI, R. C.; SALU, B. R.; SILVA-LUCCA, R. A.; ALVES, F. L.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; da SILVA FERREIRA, R.; SAMPAIO, M. U.; VILELA OLIVA, M. L. Biotechnological Potential of *Araucaria angustifolia* Pine Nuts Extract and the Cysteine Protease Inhibitor AaCI-2S. **Plants**, v. 9, p. 1676, 2020.

SANT'ANNA, V.; BIONDO, E.; KOLCHINSKI, E. M.; da SILVA, L. F. S.; CORRÊA, A. P. F.; BACH, E.; BRANDELLI, A. Total Polyphenols, Antioxidant, Antimicrobial and Allelopathic Activities of Spend Coffee Ground Aqueous Extract. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 439-442, 2016.

SANTOS, C. H. K.; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*Araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 216–223, 2018.

SANTOS, C. H. K.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; BARREIRO, M. F.; GONÇALVES, O. H.; BONA, E.; SILVA, M. V.; FERREIRA, I. C. F. R.; LEIMANN, F. V. Efeito do teor de etanol na composição de compostos fenólicos

extraídos da casca de sementes de pinhão. In: 10^o Encontro Nacional de Cromatografia, 2017, Bragança, Portugal. **Anais...** Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2017.

SANTOS, H. S.; SOUZA, W. M. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

SCHONS, J. I.; FIORI, K. P.; RIBEIRO, E. B.; ANDRIGHETTI, C. R.; NOGUEIRA, R.; VALLADÃO, D. M. S. Extração assistida por ultrassom e caracterização do óleo da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Interciência**, v. 42, n. 9, p. 586-590, 2017.

SCHVEITZER, B.; ROSA, A. M. da; GRANEMANN, P.; KLOCK, A. L. S.; RIZZATI, I. M.; FOPPA, T. Caracterização química de pinhões-sementes de *Araucária Angustifolia* em diferentes formas de preparo. **Revista Interdisciplinar De Estudos Em Saúde**, v.3, p. 93-104, 2014.

SERAFINI, M.; TESTA, M. F. Redox ingredients for oxidative stress prevention: the unexplored potentiality of coffee. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 225–229, 2009.

SHUAI, X.; DAI, T.T.; CHEN, M.S.; LIANG, R.; DU, L.; CHEN, J.; LIU, W. Comparative study on the extraction of macadamia (*Macadamia integrifolia*) oil using different processing methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 154, 2022.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2022. **CA Cancer Journal Clinics**, v. 72, p. 7-33, 2022.

SILVA, C.; GARCIA, V. A. S.; FRANCISCATO, L. M. S. S. Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos das Cascas de Lichia (*Litchi Chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 81-96, 2016.

SILVA, F. H. L.; FERNANDES, J. S. C.; ESTEVES, E. A.; TITON, M.; SANTANA, R. C. Populações, matrizes e idade da planta na expressão de variáveis físicas em frutos do pequizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 806-813, 2012.

SILVA, R. S.; BARBIERI, H. B.; FERREIRA, H. S.; SILVA, C. A.; NEBO, L. Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da espécie *Caryocar brasiliense*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. 1-13, 2021.

SILVA, S. M.; KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; CASTOLDI, R.; de MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; PERALTA, R. A.; de SOUZA, C. G. M.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; PERALTA, R. M. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat

(*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1-8, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SIPOS, S.; MOACĂ, E. A.; PAVEL, I. Z.; AVRAM, Ș.; CRETU, O. M.; CORICOVAC, D.; RACOVICIANU, R. M.; GHIULAI, R.; PANĂ, R. D.; ȘOICA, C. M.; BORCAN, F.; DEHELEAN, C. A.; CRĂINICEANU, Z. *Melissa officinalis* L. Aqueous Extract Exerts Antioxidant and Antiangiogenic Effects and Improves Physiological Skin Parameters. **Molecules** v. 26, n. 8, p. 2369, 2021.

SOUZA, M. O.; BRANCO, C. S.; SENE, J.; DALLGNOLL, R.; AGOSTINI, F.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Antioxidant and antigenotoxic activities of the Brazilian pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 24-37, 2014.

SOUZA, K. C.; CORREA, L. G.; YAMAGUCHI, M. M.; SAKANAKA, L. S.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Desenvolvimento de filmes antioxidantes de isolado proteico de soja adicionados de extrato da casca de pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). In: NETO, B. R. S da (Org.). **A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde v.2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. cap. 24. p. 204-211.

SOUZA, W. F.; ARAÚJO, W. M.; FREITAS-JUNIOR, J. C.; MORGADO-DÍAZ, J. A. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**. v. 66, n. 1, p. 30-33, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000100013>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SUMERE, B. R.; de SOUZA, M. C.; dos SANTOS, M. P.; BEZERRA, R. M. N.; da CUNHA, D. T., MARTINEZ, J.; ROSTAGNO, M.A. Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 151–162, 2018.

SUN, J.; LIANG, F.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007.

TASHIRO, E.; IMOTO, M. Chemistry and biology of the compounds that modulate cell migration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 23, p. 213-219, 2016.

THOE, T. B.; ASPINWALL, D. K.; WISE, M. L. H. Review on ultrasonic machining. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 38, p. 239-255, 1998.

THYS, R. C. S.; CUNHA, M. Avaliação do Tratamento Térmico da Semente do Pinhão no Teor de Amido Resistente e de Compostos Fenólicos de sua Farinha. In: 5º Simpósio de Segurança Alimentar. Alimentação e Saúde. Bento Gonçalves, 2015. **Anais...** Bento Gonçalves, 2015.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100-109, 2015.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

TOSOC, J. P. S.; NUÑEZA, O. M.; SUDHA, T.; DARWISH, N. H. E.; MOUSA, S. A. Anticancer Effects of the *Corchorus olitorius* Aqueous Extract and Its Bioactive Compounds on Human Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 603, 2021.

TROJAIKE, G. H.; BIONDO, E.; PADILHA, R. L.; BRANDELLI, A.; SANT'ANNA, V. Antimicrobial Activity of *Araucaria angustifolia* Seed (Pinhão) Coat Extract and its Synergism with Thermal Treatment to Inactivate *Listeria monocytogenes*. **Food Bioprocess Technology**. v.12, p. 193-197, 2019.

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 55-64, 2015.

VIANA, A.R.; MARZARI, J.; WERGUTZ, J.; KRAUSE, L.M.F. Bioactive Products in the Prevention and Treatment of Cancer, in particular Melanoma. **Disciplinarum Scientia**, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017.

WEBER, A. V. Potencial Efeito Antioxidante e Antiproliferativo do Extrato Aquoso de *Carya Illinoensis* sobre Células Tumerais. **Revista Contexto & Saúde**, v. 18, n. 35, p. 91-94, 2018.

WEN, C.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; DZAH, S. C.; ZANDILE, M.; DUAN, Y.; MA, H.; LUO, X. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 48, p. 538-549, 2018.

YAMAMOTO, S.; OTTO, A.; SIMONEIT, B. R. T. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrom**, v. 39, p. 1337-1347, 2004.

XIE, U.; HUANG, L.; ZHANG, C.; ZHANG, Y. Phenolic compositions, and antioxidante performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. **Journal of Functional Foods**, v.16, p. 460–471, 2015.

WU, Z.; LIU, B.; ZHANG, Q.; LIU, J.; CHEN, N.; CHEN, R; ZHU, R. Resveratrol inhibits the prolifreation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis. **Molecular Medicine Reporter**, v. 11, n.1, p. 400-404, 2015.

ZENG, G.; LIU, J.; CHEN, H.; LIU, B.; ZHANG, Q.; LI, M.; ZHU, R. Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells. **Oncology Reports**, v. 31, n. 6, p. 2713-2719, 2014.

ZORTÉA-GUIDOLIN, M. E. B.; DEMIATE, I. M.; GODOY, R. C. B.; DE SCHEER, A. DE P.; GREWELL, D.; JANE, J. LIN. Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 19–26, 2017.