

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

THAÍS ESTÉFANE FISCHER

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BRÁCTEAS
ESTÉREIS DE *Araucaria angustifolia* BASEADO NAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E
BIOATIVIDADE

PONTA GROSSA

2022

THAÍS ESTÉFANE FISCHER

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BRÁCTEAS
ESTÉREIS DE *Araucaria angustifolia* BASEADO NAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E
BIOATIVIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pertencente ao Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Alberti.

PONTA GROSSA

2022

Fischer, Thaís Estéfane

F529 Otimização da extração de compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* baseado nas propriedades químicas e bioatividade / Thaís Estéfane Fischer. Ponta Grossa, 2022.
83 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Alberti.

1. Metodologia de superfície de resposta. 2. Compostos fenólicos. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana. I. Alberti, Aline. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

CDD: 664

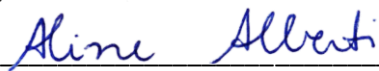
TERMO DE APROVAÇÃO

THAÍS ESTÉFANE FISCHER

“Otimização da extração de compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* baseado nas propriedades químicas e bioatividade”.

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre(a) no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a): Prof. Dr^a. Aline Alberti



Prof^a. Dr^a. Aline Alberti (UEPG-PR - Presidente)



Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski (UFSC-SC -Membro titular)



Prof. Dr. Alessandro Nogueira (UEPG-PR - Membro titular)

Ponta Grossa, 07 de março de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida e família. Sou grata por todos os momentos em que Tu me destes força e saúde para enfrentar os desafios que surgiram nesta caminhada.

Aos meus pais, Villi Fischer e Maldí Weiss Fischer, por todo apoio, dedicação e incentivo, não somente durante esta caminhada, mas em toda a minha vida. Serei eternamente grata!

Ao meu irmão, Guilherme Fischer, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Maycon Willian Orlonski por todo apoio e por sempre estar ao meu lado.

À professora Dra. Aline Alberti pelas orientações e todos os conhecimentos, pela paciência e amizade. Aos professores Dr. Alessandro Nogueira, Dr. Luiz Gustavo Lacerda e Dr. Acácio A. F. Zielinski por todas as contribuições e participação nas bancas de projeto, qualificação e defesa da dissertação.

À Amanda Marcondes, aluna de iniciação científica, que acompanhou e auxiliou em algumas análises.

Ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB), em especial à Dra. Lillian Barros e equipe pela parceria.

Aos colegas e amigos do Grupo de Trabalho sobre a Maçã e da Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela infraestrutura.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Aos amigos pelo apoio e companheirismo nesta jornada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste projeto.

Muito obrigada!

RESUMO

As brácteas estéreis, que representam aproximadamente 80% da pinha de *Araucaria angustifolia*, são uma fonte de compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana. Esses compostos podem ser recuperados e aplicados em produtos alimentícios, objetivando o aumento do teor de compostos bioativos, atividades antioxidante e antimicrobiana, bem como propriedades funcionais. Sendo assim, a extração desses foi otimizada utilizando a metodologia de superfície de resposta através do planejamento Box Behnken. A caracterização fenólica foi realizada por meio da quantificação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavonóis e taninos condensados, enquanto que a quantificação e identificação de compostos fenólicos individuais foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada por métodos baseados na captura dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico (ABTS), e pelos métodos de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) e capacidade antioxidante redutora cúprica (CUPRAC). A atividade antimicrobiana foi avaliada quanto a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo, enquanto a atividade antiglicêmica foi realizada por meio da inibição da α -glucosidase. A análise de atividades baseada em células foi realizada por meio das análises de citotoxicidade, antioxidante celular, anti-inflamatória e antiproliferativa. A otimização indicou condições ótimas de extração quando obtidas com etanol 60% (v/v), razão soluto/solvente de 1:38 (p/v) e à temperatura de 80 °C. Os compostos observados no extrato foram o ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol, os quais estão relacionados com propriedades bioativas. O extrato apresentou elevados teores para as classes fenólicas e atividade antioxidante pelos métodos analisados. A atividade inibitória na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 81,3%, 86,9%, 83,5% e 79,7% para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, respectivamente, enquanto para *Lactobacillus brevis* o extrato inibiu 27,9% e 19,5% nas concentrações de 15.000 e 10.000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Porém, em menores concentrações *L. brevis* demonstrou resistência, indicando que o extrato poderia ser aplicado em produtos lácteos fermentados, visando a obtenção de um produto funcional, devido sua propriedade antiglicêmica, a qual demonstrou atividade inibitória de α -glucosidase aproximadamente 10 vezes superior ao fármaco utilizado para esta finalidade. O extrato não apresentou atividade antioxidante celular e anti-inflamatória, mas apresentou atividade antiproliferativa contra células tumorais (carcinoma de estômago, intestino e mama). Entretanto, o extrato apresentou toxicidade para as células não tumorais PLP2 ($\text{GI}_{50} = 41 \pm 3 \mu\text{g/mL}$) e VERO ($\text{GI}_{50} = 75 \pm 7 \mu\text{g/mL}$). Portanto, estudos futuros podem ser realizados para elucidar mais informações sobre a atividade tóxica do extrato para aplicar em alimentos, inclusive com outros métodos de extração e solventes.

Palavras-chave: Metodologia de Superfície de Resposta. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Atividade anti-inflamatória. Atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

The sterile bracts, which represent approximately 80% of *Araucaria angustifolia* pinecone, are a source of phenolic compounds that have antioxidant and antimicrobial activity. These compounds can be recovered and applied in food products, aiming to increase the content of bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities, as well as functional properties. Therefore, the extraction of these was optimized using the response surface methodology through Box Behnken planning. The phenolic characterization was performed by quantifying the content of total phenolic compounds, total flavonoids, flavonols and condensed tannins, while the quantification and identification of individual phenolic compounds were performed by High Performance Liquid Chromatography. The antioxidant activity was evaluated by methods based on the capture of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzenethiazoline)-6-sulfonic (ABTS) radicals, and by ferric reducing antioxidant power (FRAP) and copper reducing antioxidant capacity (CUPRAC). The antimicrobial activity was evaluated as the minimum inhibitory concentration by the broth microdilution technique, while the antiglycemic activity was performed through the inhibition of α -glucosidase. The analysis of cell-based activities was performed through cytotoxicity, cellular antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative analyses. The optimization indicated optimal extraction conditions when obtained with 60% ethanol (v/v), solute/solvent ratio of 1:38 (w/v) and at a temperature of 80 °C. The compounds observed in the extract were gallic acid, catechin, epicatechin, quercetin and kaempferol, which are related to bioactive properties. The extract showed high levels for the phenolic classes and antioxidant activity by the analyzed methods. The inhibitory activity at the concentration of 10,000 $\mu\text{g/mL}$ was 81.3%, 86.9%, 83.5% and 79.7% for *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*, respectively, while for *Lactobacillus brevis* the extract inhibited 27.9% and 19.5% at concentrations of 15,000 and 10,000 $\mu\text{g/mL}$, respectively. However, at lower concentrations, *L. brevis* showed resistance, indicating that the extract could be applied to fermented dairy products, aiming to obtain a functional product, due to its antiglycemic property, which demonstrated α -glucosidase inhibitory activity approximately 10 times higher than the drug used for this purpose. The extract did not show cellular antioxidant and anti-inflammatory activity, but showed antiproliferative activity against tumor cells (stomach, intestine and breast carcinoma). However, the extract showed toxicity to non-tumor cells PLP2 ($\text{GI}_{50} = 41 \pm 3 \mu\text{g/mL}$) and VERO ($\text{GI}_{50} = 75 \pm 7 \mu\text{g/mL}$). Therefore, future studies can be carried out to elucidate more information about the toxic activity of the extract to be applied in foods, including with other extraction methods and solvents.

Keywords: Response Surface Methodology. Phenolic compounds. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Anti-inflammatory activity. Anti-proliferative activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantidade produzida de pinhão (toneladas).....	14
Figura 2 - Reação de estabilização do radical livre DPPH.....	18
Figura 3 - Reação de estabilização do radical ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	19
Figura 4 - Reação química que descreve a produção de Fe ²⁺ a partir da redução de Fe ³⁺ presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).	19
Figura 5 – Reação de redução dos íons cúpricos (CUPRAC).	20
Figura 6 – <i>Araucaria angustifolia</i> (1), pinhas (2), pinhões (3) e brácteas estéreis (4).....	35
Figura 7 – Fluxograma geral de obtenção do extrato fenólico de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	36
Figura 8 - Superfície de resposta mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes.....	45
Figura 9 - Extrato fenólico de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	47
Figura 10 - Fluxograma geral dos procedimentos analíticos do extrato de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição fenólica e atividade antioxidante de diferentes partes da <i>Araucaria angustifolia</i>	17
Tabela 2 - Planejamento Box-Behnken aplicado para a extração de compostos fenólicos de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	37
Tabela 3 - Compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC), taninos (TAN) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	42
Tabela 4 - Efeitos das variáveis independentes (concentração de solvente, razão soluto/solvente e temperatura) para avaliação das variáveis dependentes utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.....	44
Tabela 5 - Composição fenólica e atividade antioxidante do extrato de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	57
Tabela 6 - Atividade antiproliferativa e de citotoxicidade do extrato de brácteas estéreis de <i>Araucaria angustifolia</i>	61

LISTA DE SIGLAS

AAPH	Dicloridrato de 2,2 2'-azobis(2-metilpropionamida)
ABAP	Dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
AGS	Carcinoma de estômago
AHLs	N-acil-homoserina lactonas
CaCo-2	Carcinoma de intestino
CATE	Equivalente de catequina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCF	Diclorofluoresceína fluorescente
DCFH	2',7'-diclorohidrofluoresceína
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Epicatequina
FAS-II	Ácido graxo tipo II
FIC	Habilidade quelante de íons ferrosos
FRAP	Poder antioxidante da redução do ferro
GI ₅₀	Concentração do extrato necessária para inibir 50% da proliferação celular
GCO	Observatório Global de Câncer
HAI-1	Acil homoserina lactona
HBSS	Sais balanceados de Hank
HNE	Elastase neutrofílica humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração mínima efetiva para obtenção de 50% do efeito máximo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LPO	Capacidade de inibir a peroxidação lipídica
LPS	Lipopolissacarídeo
MCF-7	Carcinoma de mama
MIC	Concentração inibitória mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta

NO	Óxido nítrico
PLP2	Cultura primária de células hepáticas não tumorais de fígado suíno
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforrodamina B
TAE	Equivalente de ácido tânico
TAN	Taninos
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Trolox (Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
VERO	Linhagem de células originária de rim de macaco <i>Cercopithecus aethiops</i>
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 <i>Araucaria angustifolia</i>	14
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	15
1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SEU MECANISMO DE AÇÃO	20
1.4 ATIVIDADE ANTIGLICÊMICA	26
1.5 ATIVIDADE DE CITOTOXICIDADE CELULAR	28
1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM CÉLULAS	29
1.7 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	29
1.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	31
1.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BRÁCTEAS ESTÉREIS DE <i>Araucaria angustifolia</i>	33
RESUMO	33
2.1 INTRODUÇÃO	33
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.2.1 Materiais	34
2.2.2 Métodos	35
2.2.2.1 Obtenção do extrato fenólico	36
2.2.2.2 Planejamento experimental	37
2.2.2.3 Caracterização fenólica	38
2.2.2.4 Atividade antioxidante	39
2.2.2.5 Compostos fenólicos individuais	40
2.2.2.6 Cor do extrato	40
2.2.2.7 Análise estatística	41
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.3.1 Otimização da Extração de Compostos Fenólicos	41
2.3.2 Compostos Fenólicos Individuais	46
2.3.3 Cor do Extrato	47
2.4 CONCLUSÃO	48
CAPÍTULO 3: ANÁLISE DO PERFIL FENÓLICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>, ANTIMICROBIANA, ANTIGLICÊMICA, ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIPROLIFERATIVA E CITOTOXICIDADE DE BRÁCTEAS ESTÉREIS DE <i>Araucaria angustifolia</i>	49
RESUMO	49
3.1 INTRODUÇÃO	49
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	50

3.2.1	Materiais	50
3.2.2	Métodos	51
3.2.2.1	Obtenção do extrato fenólico	52
3.2.2.2	Caracterização fenólica e atividade antioxidante	52
3.2.2.3	Atividade antimicrobiana do extrato fenólico	53
3.2.2.4	Atividade antiglicêmica do extrato fenólico	53
3.2.2.5	Atividade antioxidante celular	54
3.2.2.6	Atividade anti-inflamatória	55
3.2.2.7	Atividade antiproliferativa e hepatotoxicidade	55
3.2.2.8	Análise estatística	56
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.3.1	Caracterização Fenólica e Atividade Antioxidante do Extrato	56
3.3.2	Atividade Antimicrobiana	58
3.3.3	Atividade Antiglicêmica	59
3.3.4	Atividade Antioxidante Celular	60
3.3.5	Atividade Anti-Inflamatória	60
3.3.6	Atividade Antiproliferativa e Hepatotoxicidade	61
3.4	CONCLUSÃO	63
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	66

INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* pertence à família Araucariaceae, encontrada principalmente na região sul do Brasil e em países como a Argentina, Paraguai e Chile. É classificada como uma espécie dioica e produz pinhas. A pinha é constituída por sementes conhecidas como pinhão e por sementes estéreis, conhecidas como brácteas, estas constituindo aproximadamente 80% da pinha. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil teve uma produção de 9342 toneladas de pinhão em 2019.

As brácteas apresentam em sua composição compostos fenólicos, os quais desempenham atividades antioxidantes, antimutagênicas e antibacterianas, motivo este que despertou interesse para utilização desta matéria-prima, que não apresenta aplicação tecnológica. Os compostos observados em brácteas estéreis são catequina, epicatequina, quercetina, apigenina e rutina. Alimentos ricos nestes compostos podem ser uma alternativa para redução e controle da hiperglicemia pós-prandial, minimizando os sintomas do diabetes. Além disso, os flavonoides apresentam atividade anti-inflamatória, além da propriedade sequestradora de radicais livres, auxiliando na redução de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2019).

Diversos fatores influenciam a extração de compostos fenólicos com ação bioativa, principalmente no que diz respeito ao solvente, tempo, temperatura, razão soluto/solvente e método utilizado, além da natureza química da amostra. Levando isso em consideração, a otimização da extração é imprescindível para obtenção do melhor perfil fenólico. A toxicidade do solvente utilizado no processo de extração deve ser considerada quando o propósito é a aplicação do extrato em alimentos. Portanto, é indicada a utilização de “solventes verdes” que possuam grau alimentício, como o etanol. Ademais, para que o extrato fenólico seja aplicado em alimentos, realizar previamente a caracterização deste é uma etapa importante a ser considerada, visando elucidar suas características e propriedades para formulação de um produto com propriedades funcionais sem efeitos negativos de sabor e aparência.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração dos compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*, bem como realizar a caracterização fenólica e atividades antioxidante *in vitro*, antimicrobiana, antiglicêmica, antioxidante celular, anti-inflamatória, antiproliferativa e citotoxicidade.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Otimizar a extração de compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* e realizar a caracterização do extrato fenólico do ponto otimizado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração de compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato otimizado de brácteas estéreis.
- Realizar a caracterização do extrato fenólico a partir das análises de atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*
- Avaliar as propriedades bioativas por meio de análises de bioatividade.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

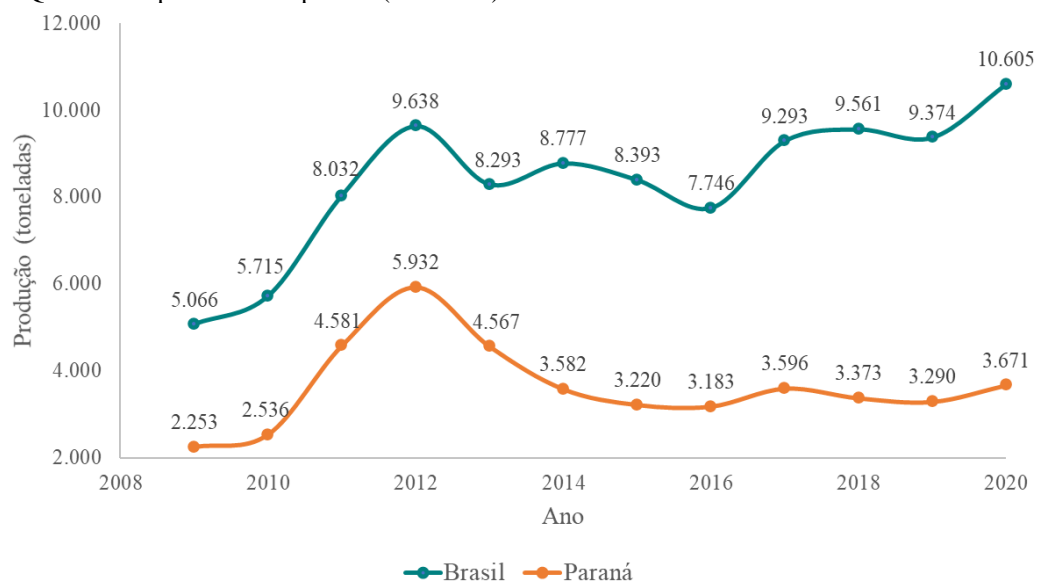
Neste capítulo serão abordados temas relacionados ao estado da arte da *Araucaria angustifolia*. Posteriormente, são apresentadas as principais classes de compostos fenólicos e as propriedades bioativas que estes apresentam, principalmente relacionadas aos compostos presentes nas brácteas estéreis da *Araucaria angustifolia*.

1.1 *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* é uma planta pertencente à família Araucariaceae, sendo pertencente ao grupo das coníferas e encontrada principalmente na região sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Chile. Classificada como espécie dioica, ou seja, consiste em uma planta que apresenta flores masculinas e femininas em indivíduos separados (feminino e masculino). O estróbilo feminino (pinha) é constituído por sementes, as quais são comestíveis e denominadas pinhão, e por brácteas (sementes estéreis), que constituem cerca de 80% da pinha (MICHELON *et al.*, 2012; SOARES; MOTA, 2004).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil teve uma produção de 10.605 toneladas de pinhão em 2020, sendo o Paraná o estado com maior quantidade produzida com um total de 3.671 toneladas no mesmo ano. Em 2009 uma produção de 5066 toneladas foi observada, resultando em um aumento de 109%, quando comparado aos valores de 2020 (Figura 1).

Figura 1 - Quantidade produzida de pinhão (toneladas).



Fonte: IBGE (2022).

O pinhão é considerado, botanicamente, como pseudofruto, sendo que a pinha (ovário) possui 10 a 25 cm de diâmetro, sendo constituída por cerca de 5 a 150 pinhões, os quais apresentam dimensão e peso de 6 cm por 2,5 cm e cerca de 9 g. O pseudofruto é composto principalmente por amido e aminoácidos, 54,7% e 5,1%, respectivamente (SOARES; MOTA, 2004). De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), o pinhão cozido possui 50,5% de umidade, 3,0% de proteínas, 0,7% de lipídeos, 43,9% de carboidratos e 15,6% de fibra alimentar.

O pinhão é constituído por uma casca resistente formada por um material rico em lignocelulose (lignina e celulose/hemicelulose) e por uma polpa comestível em seu interior. O pinhão geralmente é consumido na forma cozida em água ou assada, além de sua utilização como farinha em pratos regionais. Entretanto, têm-se observado um crescente interesse por esta cultura como matéria prima para produção de produtos à base de pinhão, como por exemplo o pinhão em conserva e na aplicação de cerveja e outras bebidas (FREITAS *et al.*, 2018; JORGE *et al.*, 2018; SANT'ANNA *et al.*, 2016).

Em outros estudos, foram avaliados a capacidade das brácteas na adsorção de íons e corantes metálicos durante o tratamento de efluentes industriais, como da indústria de curtumes e metalúrgica. Esta capacidade de adsorção se deve, principalmente, à presença de taninos, resultando também na coloração marrom intensa das brácteas (CALVETE *et al.*, 2009; CALVETE *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008; ROYER *et al.*, 2009).

Extratos ricos em taninos vêm demonstrando que estes possuem a propriedade de inibição da α -amilase salivar e pancreática, resultando em uma redução da velocidade de digestão de carboidratos e glicose, sugerindo que extratos com altos teores de taninos podem ser utilizados para acabar com a hiperglicemia pós-prandial, além disso, pode ser utilizada na perda de peso, combatendo a obesidade (PERALTA *et al.*, 2016).

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, onde desempenham funções na reprodução, crescimento e na defesa das plantas contra o ataque de pragas (ANGELO; JORGE, 2007; SOARES *et al.*, 2008). Estes compostos são amplamente estudados devido apresentarem atividades antioxidantes, antimutagênicas, antibacterianos, imunomoduladores e análogos hormonais (AL-HABIB *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em duas principais classes fenólicas: ácidos fenólicos e flavonoides. Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em derivados do

ácido benzóico, representados pelos ácidos gálico, vanílico e protocatecuico, ou derivados do ácido cinâmico, o qual inclui os ácidos p-cumárico, cafeico e ferúlico. Ainda, o ácido hidroxicinâmico pode originar ácidos fenólicos, como no caso do ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico). Os principais ácidos fenólicos encontrados na *Araucaria angustifolia* consistem nos ácidos gálico, benzóico, p-cumárico, hiidroxicinâmico, ferúlico, cafeico, protocatecuico e derivados de éster de ácido clorogênico (BRANCO *et al.*, 2016).

A classe dos flavonoides pode ser subdividida em flavan-3-ols, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas. Nas brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* estão presentes principalmente a catequina, epicatequina, apigenina, quercetina, e rutina, pertencentes às subclasses dos flavan-3-ols, flavonas e flavonóis, respectivamente. Estes compostos são responsáveis pela elevada atividade antioxidante e antimutagênica deste subproduto (BRANCO *et al.*, 2016; MICHELON *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos presentes em matrizes vegetais podem variar de acordo com a região da planta. Na Tabela 1 são apresentados teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante observada em diferentes partes da *Araucaria angustifolia*.

Tabela 1 - Composição fenólica e atividade antioxidante de diferentes partes da *Araucaria angustifolia*.

Região da planta	Compostos fenólicos			Atividade Antioxidante			Referência
	Classe/composto	Valor	Unidade	Método	Valor	Unidade	
Brácteas	Compostos fenólicos totais	47,61	mg TAE/g	ABTS	427,28	μmol TE/g	Dorneles; Noreña (2020).
	Taninos totais	27,09	mg TAE/g	DPPH	467,79	μmol TE/g	
	Taninos condensados	779,95	mg CATE/g				
	Compostos fenólicos totais	1,06	mg CATE/g	DPPH	10,00	IC ₅₀	Michelon <i>et al.</i> (2012).
	Catequina	2,81	mg CAT/g	SOD-like activity	14,70	IC ₅₀	
	Epicatequina	0,74	mg EC/g	Catalase-like activity	137,50	mmol H ₂ O ₂ /min ⁻¹	
	Rutina	0,26	mg rutina/g				
Casca da semente	Ácidos fenólicos totais	5,40	mg/g	ABTS	54,64	μmol TE/g	Freitas <i>et al.</i> (2018).
	Flavonoides totais	14,19	mg/g	DPPH	11,78	μmol TE/g	
	Compostos fenólicos totais	19,59	mg/g	FRAP	2,09	μmol TE/g	
Semente crua		0,23	mg CAT/g				Cordenunsi <i>et al.</i> (2004).
	Compostos fenólicos totais	2,96	mg EAG/g	DPPH	870,70	μg/mL	Koehnlein <i>et al.</i> (2012).
	Flavonoides	0,58	mg CATE/g	ABTS	170,70	μg/mL	
	Protoantocianidinas	0,225	mg CATE/g	FIC	1719,00	μg/mL	
	Catequina	0,175	mg/g	LPO	55,90	μg/mL	
	Ácido gálico	0,0036	mg/g				
Quercetina	0,0007	mg/g					
Própolis	Ácido protocatecuico	9,1	μg/mL				Meneghelli <i>et al.</i> (2013).
	Derivados de éster de ácido clorogênico	7,9	μg/mL				
	Ácido p-cumárico	<1,8	μg/mL				
Casca morta	Compostos fenólicos totais	64	mg EAG/g				Seccon <i>et al.</i> (2010).
	Antocianina	1,85	mg/g				
	Proantocianidinas	12	mg/g				

Nota: TAE: equivalente de ácido tânico; CATE: equivalente de catequina; CAT: catequina; EC: epicatequina; TE: Trolox; EAG: equivalente de ácido gálico; ABTS: método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico; DPPH: método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; FRAP: poder antioxidante da redução do ferro; SOD: superóxido dismutase; FIC: habilidade quelante de íons ferrosos; LPO: capacidade de inibir a peroxidação lipídica.

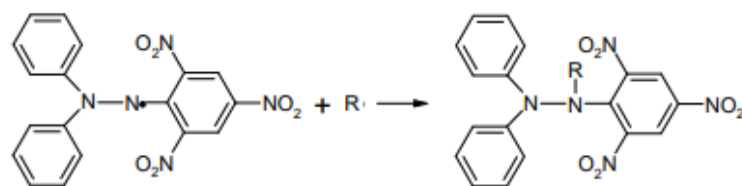
A atividade antioxidante consiste em uma ação biológica do sistema de defesa que auxilia no controle dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), reduzindo os danos oxidativos. A manutenção do equilíbrio do sistema antioxidante é importante, uma vez se este estiver em desequilíbrio pode resultar em estresse oxidativo, o qual exerce efeitos significativos na ocorrência de doenças crônicas-degenerativas e câncer (BRANCO *et al.*, 2016).

Métodos *in vitro* e *in vivo* de análise da atividade antioxidante são realizados. Resultados de análises *in vitro* são apresentados na Tabela 1 para diferentes regiões da *Araucaria angustifolia*. Em um estudo *in vitro* realizado por Michelon *et al.* (2012), os autores utilizaram levedura eucariótica *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar a atividade antioxidante do extrato de brácteas de *Araucaria angustifolia* e observaram que o extrato evitou completamente o efeito citotóxico induzido por peróxido de hidrogênio nas células. Uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais foi observada pelos autores, indicando que a atividade antioxidante é decorrente dos compostos presentes no extrato de brácteas.

Yamaguchi; Kato e Mascio (2009), observaram que a fração biflavonoide extraída de folhas de *Araucaria angustifolia* apresentou efeitos positivos de proteção do DNA do timo de bezerros dos danos induzidos pela radiação ultravioleta. Em um estudo anterior, os autores observaram que a fração biflavonoide de folhas de *A. angustifolia* apresentou eficiência na eliminação de oxigênio singlete (1O_2), na proteção do DNA do plasmídeo evitando a quebra de fita simples causada pelo 1O_2 e na proteção de lipossomas contra a degradação peroxidativa causada pela irradiação ultravioleta (YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante *in vitro* pode ser determinada por meio de diversas metodologias, dentre elas ressalta-se o método de DPPH, o qual é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) pelos compostos antioxidantes, resultando na redução da coloração, a qual pode ser quantificada por meio da leitura da absorbância da solução, reação demonstrada na Figura 2 (EMBRAPA, 2007).

Figura 2 - Reação de estabilização do radical livre DPPH.



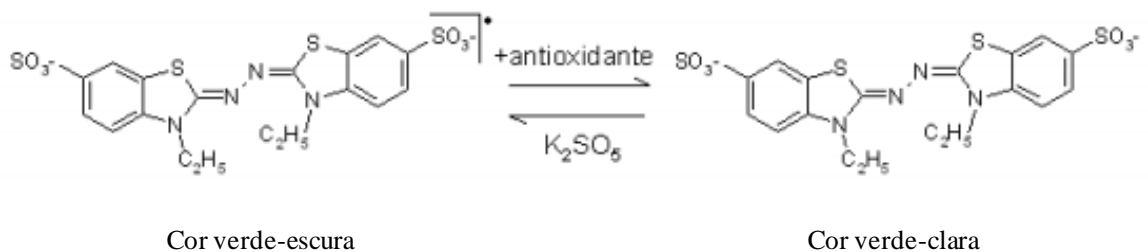
Cor violeta-escura

Cor violeta-clara

Fonte: EMBRAPA, 2007.

Outro método muito aplicado é o de captura do radical $ABTS^+$ (Figura 3), por meio do precursor ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico, o qual é formado por meio de reações químicas, eletroquímicas ou enzimáticas, tendo como objetivo mensurar a capacidade antioxidante de substâncias puras, misturas e bebidas aquosas (EMBRAPA, 2007; RE *et al.*, 1999).

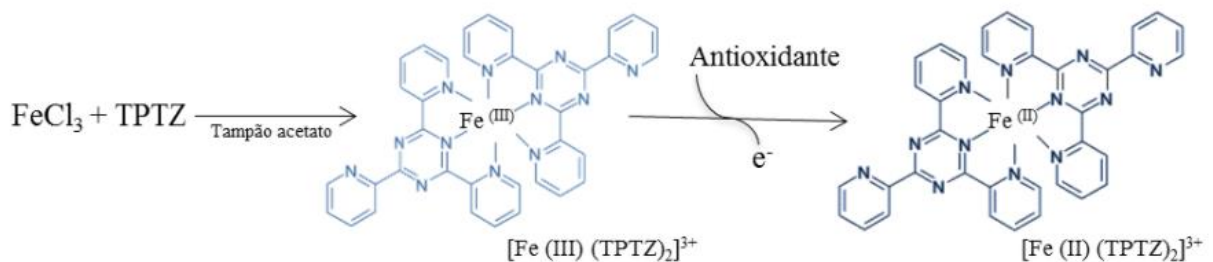
Figura 3 - Reação de estabilização do radical $ABTS^+$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: EMBRAPA, 2007.

O método de FRAP (poder antioxidante da redução do ferro) é uma técnica fundamentada na capacidade de produção do íon ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}), a partir da redução do íon ferro na forma férrica (Fe^{3+}), que pode ser observada através da modificação da intensidade da cor, inicialmente roxo claro passando a uma tonalidade de roxo escuro, quando os compostos fenólicos presentes na amostra entram em contato com uma solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), conforme demonstrado na Figura 4. Esta tonalidade observada e, de modo consequente, a absorbância medida no comprimento de onda de 595 nm serão diretamente proporcionais ao potencial antioxidante (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016).

Figura 4 - Reação química que descreve a produção de Fe^{2+} a partir da redução de Fe^{3+} presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).



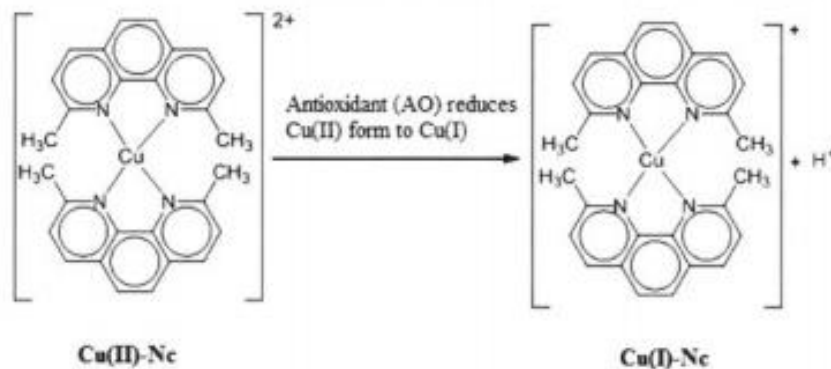
Fonte: Urrea-Victoria *et al.* (2016).

O método de FRAP analisa a força antioxidante da amostra, implicando em uma limitação somente a mecanismos com transferência de elétrons, uma vez que nem todos os

compostos com capacidade redutora para reduzir o ferro da forma férrica para a sua forma ferrosa é classificado como antioxidante, da mesma maneira que nem todos os antioxidantes possuem a capacidade redutora específica para realizar a redução do ferro descrita. Apesar das limitações que o método apresenta, este pode ser utilizado de modo combinado com outras metodologias de atividade antioxidante, resultando em conclusões baseadas a distinção dos mecanismos de ação (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012).

O método de atividade antioxidante redutora de íons cúpricos, CUPRAC, é uma técnica simples e possui versatilidade para ser utilizada em uma ampla gama de classes de polifenóis. Logo, é aplicado na quantificação da atividade antioxidante de ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, antocianinas, antioxidantes sintéticos, entre outros, demonstrando que o método é eficaz para quantificar igualmente bem antioxidantes de natureza hidrofílica e lipofílica (ÖZYÜREK *et al.*, 2011). A reação de redução do cobre resulta a um quelato colorido de Cu(I)-Nc, sendo possível quantificar esta coloração por meio de colorímetros ou espectrofotômetros, de modo que a absorbância máxima é observada no comprimento de onda de 450 nm (Figura 5).

Figura 5 – Reação de redução dos íons cúpricos (CUPRAC).



Fonte: Özyürek *et al.* (2011).

Como relatado por Özyürek *et al.* (2011), o reagente CUPRAC possui certa seletividade e isto é devido ao seu reduzido potencial redox. Além disso, apresenta elevada estabilidade e acessibilidade.

1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SEU MECANISMO DE AÇÃO

Os compostos bioativos obtidos de matrizes vegetais apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica, sendo os compostos fenólicos os responsáveis por esta atividade (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010). Estudos demonstram que

alguns microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* demonstram inibição quando entram em contato com taninos, sendo que este apresentou também atividade inibitória para alguns fungos, como por exemplo, o fungo *Fomes annosus* (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os agentes antimicrobianos possuem sua atividade relacionada à inibição da síntese da parede celular, ruptura de membrana, inibição de ácido nucleico ou síntese de proteínas e interferência na síntese de folato. Os fenólicos possuem a capacidade de danificar as células microbianas, modificando a propriedade de permeabilidade seletiva da membrana plasmática, resultando na perda de substâncias intracelulares (AL-HABIB *et al.*, 2010).

Diversos compostos pertencentes à classe dos flavonoides demonstram elevada atividade antibacteriana, atuando na proteção contra patógenos de plantas e no combate à patógenos humanos quando consumidos na dieta. Os mecanismos de ação antimicrobiana variam para cada flavonoide presente nas brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Mecanismos antimicrobianos específicos para flavonoides individuais.

(continua)

Mecanismo antimicrobiano	Flavonoide responsável	Microrganismo estudado	Atividade inibitória	Referência
Inibição da síntese de ácido nucleico (DNA-girase).	Quercetina.	<i>Escherichia coli</i>	47 µg/mL *	OHEMENG <i>et al.</i> (1993).
	Apigenina.	<i>Escherichia coli</i>	67,6 µg/mL *	
Ruptura da membrana celular.	Catequina.	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i>	9 ppm *	FATHIMA; RAO (2016).
	Apigenina.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	128 µg/mL **	BANERJEE <i>et al.</i> (2015).
		<i>Escherichia coli</i>	64 µg/mL **	
		<i>Bacillus subtilis</i>	16 µg/mL **	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	32 µg/mL **	
	Quercetina.	<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5 µg/mL **	ABUGA <i>et al.</i> (2020).
		<i>Escherichia coli</i>	1000 µg/mL **	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	125 µg/mL **	
	Rutina.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	62,5 µg/mL **	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/mL **	
Rutina.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	125 µg/mL **		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/mL **		
Inibição da bomba de efluxo.	Quercetina.	MRSA	260 µg/mL **	AMIN <i>et al.</i> (2015).
	Rutina.	MRSA	280 µg/mL **	
Inibição de biofilme.	Apigenina.	<i>Streptococcus mutans</i>	Redução de 43% de biomassa (peso seco).	KOO <i>et al.</i> (2003).
	Catequina.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Redução de 30% de biomassa (peso seco).	VANDEPUTTE <i>et al.</i> (2010).
	Quercetina.	<i>Bacillus subtilis</i>	500 µg/mL	BORDELEAU <i>et al.</i> (2018).
		<i>Listeria monocytogenes</i>	0,4 mM	VAZQUEZ-ARMENTA <i>et al.</i> (2018).
		MRSA e VRSA	250-500 µg/mL	COSTA JÚNIOR <i>et al.</i> (2018).
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8-64 µg/mL	OUYANG <i>et al.</i> (2016).
		<i>Escherichia coli</i>	20 µg/mL	YU <i>et al.</i> (2018).
Rutina.	<i>Streptococcus suis</i>	0,3125 µg/mL **	WANG <i>et al.</i> (2017).	
Inibição de enzimas de virulência (inibidor de sortase).	Quercetina.	<i>Staphylococcus aureus</i> - SrtA	52,70 µM *	KANG <i>et al.</i> (2006).
		<i>Staphylococcus aureus</i> - SrtB	33,28 µM *	

Quadro 1 – Mecanismos antimicrobianos específicos para cada flavonoide.

(conclusão)

Mecanismo antimicrobiano	Flavonoide responsável	Microrganismo estudado	Atividade inibitória	Referência
Inibição de <i>quorum sensing</i> .	Catequina.	<i>Chromobacterium violaceum</i> - Inibição de produção de violaceína.	4 mM	VANDEPUTTE <i>et al.</i> (2010).
	Epicatequina.		1000 µg/mL (33% de inibição)	BORGES <i>et al.</i> (2013).
	Apigenina.	<i>Vibrio harveyi</i>	6,25-100 µg/mL **	VIKRAM <i>et al.</i> (2010).
	Quercetina.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 µg/mL (redução de 34%, 68%, 57% e 50% a expressão lasI, lasR, rhII e rhIR, respectivamente).	OUYANG <i>et al.</i> (2016).
	Rutina.	<i>Erwinia carotovora</i> -AHLs	200 µg/mL	TRUCHADO <i>et al.</i> (2012).
Inibidor de toxinas bacterianas.	Catequina.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Inibição de produção de piocianina.	0,125 a 16 mM	VANDEPUTTE <i>et al.</i> (2010).
	Epicatequina		4 mM	
	Quercetina.	<i>Staphylococcus aureus</i>	50 µg/mL **	LEE <i>et al.</i> (2012).
	Apigenina.	<i>Staphylococcus aureus</i> - α -hemolisina	8 µg/mL **	DONG <i>et al.</i> (2012).
Inibição da síntese do envelope celular.	Quercetina.	β -hidroxiacil-ACP desidrase de <i>Helicobacter pylori</i>	39,3 \pm 2,7 µM *	ZHANG <i>et al.</i> (2009).
	Apigenina.		11,0 \pm 2,5 µM *	

Nota: *: IC₅₀; **: MIC (concentração inibitória mínima); MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina; AHLs: N-acil-homoserina lactonas.

Fonte: BIHAREE *et al.* (2020).

Os flavonoides possuem atividade antimicrobiana em consequência de sua capacidade de atuar na inibição de topoisomerasas bacterianas, as quais estão envolvidas no processo de transição topológica do DNA, ou seja, a DNA-girase é uma enzima bacteriana essencial para replicação do DNA (BIHAREE *et al.*, 2020; REECE; MAXWELL, 1991). Ohemeng *et al.* (1993) e Plaper *et al.* (2003), observaram efeito inibitório da DNA-girase da quercetina e da apigenina em *E. coli*, além disso, a quercetina também atua na indução da clivagem do DNA.

Segundo Biharee *et al.* (2020), o rompimento da membrana celular bacteriana pode resultar em problemas na respiração, osmorregulação, processo de transporte celular, biossíntese e reticulação de peptidoglicano. Alterações na fluidez e permeabilidade celular podem ser responsáveis pela ocorrência de disfunção metabólica, e possivelmente à morte bacteriana. A catequina é capaz de se ligar à bicamada lipídica, causando ruptura da membrana celular devido a formação de espécies reativas de oxigênio ou devido ao escape de potássio. A apigenina, quercetina e rutina também possuem a capacidade de causar a ruptura da membrana bacteriana. Além disso, segundo Mirzoeva; Grishanin e Calder (1997), a quercetina foi capaz de aumentar a permeabilidade da membrana, causando a redução da força motriz do próton em *S. aureus*.

As bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas no transporte de substâncias tóxicas. Alguns flavonoides podem apresentar um efeito potencializador de antibióticos, resultando na inibição da bomba de efluxo, por exemplo, a quercetina e rutina demonstraram um efeito inibitório satisfatório contra *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA), onde estes compostos foram capazes de influenciar a bomba de efluxo via vazamento de potássio (AMIN *et al.*, 2015).

Flavonoides com caráter hidrofílico são capazes de interagir com a superfície da membrana, mostrando ação contra biofilmes microbianos, os quais consistem em uma fina camada, na qual as bactérias se ligam irreversivelmente a uma superfície sólida. Os mecanismos de ação contra os biofilmes compreendem a prevenção da adesão microbiana e formação do biofilme, inibição da maturação do biofilme, ruptura da matriz polimérica extracelular do biofilme e pela eliminação de microrganismos no biofilme maduro. Dentre os flavonoides presentes nas brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*, a catequina é um flavan-3-ol que apresentou excelente atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa*, enquanto, a apigenina, quercetina e a rutina apresentaram um efeito reduzir de biofilme de *V. harveyi* e *E. coli* (ASAHI *et al.*, 2014; VIKRAM *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de ação antimicrobiana consiste na inibição da virulência dependente de enzimas bacterianas, uma vez que algumas enzimas e proteínas apresentam

aptidão de fator de virulência, exercendo um papel substancial na patogenia de doenças infecciosas. Alguns compostos fenólicos, como no caso da quercetina, podem atuar na inibição da sortase, uma transpeptidase de cisteína ligada à membrana que possui como função a adesão bacteriana, invasão no tecido hospedeiro e formação de biofilme (BIHAREE *et al.*, 2020). Kang *et al.* (2006), observaram que a quercetina foi capaz de atuar como inibidor de sortase de *S. aureus*.

A apigenina, um flavonoide da subclasse flavona, a catequina e epicatequina, dois flavan-3-ol, bem como a quercetina e rutina, dois compostos pertencentes à subclasse dos flavonóis, possuem a propriedade de inibição do *quorum sensing*, o qual consiste em um sistema de comunicação utilizado pelas bactérias e outros microrganismos que ocorre por meio da liberação de sinais químicos pelas células, gerando estímulos e respostas (KELLER; SURETTE, 2006). Em um estudo realizado por Vikram *et al.* (2010), os autores verificaram que a quercetina e a rutina apresentaram efeito inibitório de HAI-1 (sinal intra-espécie de acil homoserina lactona) e bioluminescência mediada por AI-2 em cepas de *V. harveyi*, enquanto a apigenina atuou na proteção de células humanas contra lesões provenientes de hemolisina produzida por *S. aureus*. Vandeputte *et al.* (2010), observaram que a catequina afetou significativamente a produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*, não ocorrendo produção em concentrações superiores a 4 mM de catequina. Enquanto Borges *et al.* (2013), observaram 33% de inibição de produção de violaceína por *C. violaceum* utilizando epicatequina a uma concentração de 1000 µg/mL.

Com relação à inibição de toxinas bacterianas, os flavonoides responsáveis por este mecanismo antimicrobiano consistem na catequina, epicatequina, quercetina e apigenina. A apigenina e a quercetina apresentaram efeito inibitório, por meio da redução da atividade de hemolisinas de *S. aureus*. Cerca de 95% de *S. aureus* secreta leucotoxinas e toxinas α -hemolisinas, causando a infecção em humanos por lise dos glóbulos vermelhos e/ou brancos (BERUBE; WARDENBURG, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado por Hertel *et al.* (2006), os autores verificaram que a quercetina apresentou capacidade de inibição de ácido hialurônico liases em *Streptococcus agalactiae* e que o efeito inibitório é aumentado com o aumento do número de grupamentos hidroxila na estrutura do flavonoide. Catequina (0,125 a 16 mM) e epicatequina (4 mM) foram responsáveis pela inibição de produção de piocianina de *Pseudomonas aeruginosa* (VANDEPUTTE *et al.*, 2010).

De acordo com Biharee *et al.* (2020), os fofolipídeos e os lipopolissacarídeos são compostos fundamentais para a sobrevivência bacteriana, onde o ácido graxo tipo II (FAS-II)

atua em sua biossíntese da membrana, ou seja, é possível impossibilitar a síntese do envelope celular bacteriano por meio da inibição do FAS-II. Zhang *et al.* (2009), observaram que a quercetina e a apigenina demonstraram efeito inibitório de β -hidroxiacil-ACP desidrase de *Helicobacter pylori*, bem como um efeito inibidor por competição com o substrato crotonil-CoA. Além disso, a quercetina foi relatada por Li e Tian (2004), como um flavonoide capaz de inibir o FAS-I, um ácido graxo importante na síntese de ácido micólico, o principal componente da parede celular das espécies *Mycobacterium*, incluindo o agente causador da tuberculose (*M. tuberculosis*).

Trojaike *et al.* (2018), avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de resíduo sólido de semente de *Araucaria angustifolia* e verificaram que o extrato foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* e *Aeromonas hydrophila*. Os autores também observaram um sinergismo do emprego da temperatura na presença de extrato de pinhão, aumentando a taxa de inativação de *L. monocytogenes*. Portanto, o extrato de pinhão apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias de origem alimentar e sua combinação com tratamento térmico resulta na redução da estabilidade térmica de *L. monocytogenes*, podendo ser uma alternativa para a preservação de alimentos.

As proantocianidinas encontradas em folhas de *Araucaria angustifolia* são associadas com a capacidade antiviral, como relatado por Freitas *et al.* (2009). Os autores realizaram um estudo objetivando fornecer evidências sobre a atividade antiherpes do extrato hidroetanólico obtido de folhas de *Araucaria angustifolia*, de modo que os biflavonoides isolados e as proantocianidinas do extrato demonstraram menor e maior atividade antiviral para o vírus Herpes Simplex Virus tipo 1, respectivamente.

1.4 ATIVIDADE ANTIGLICÊMICA

O Diabetes *Mellitus* tem como principais características o aumento das concentrações de glicose circulante, em combinação com o metabolismo anormal de macronutrientes, como carboidratos, lipídeos e proteínas, além de complicações vasculares. De acordo com sua classificação etiológica, o diabetes é considerado como um grupo heterogêneo de patologias pertinentes aos seus primeiros sintomas, a hiperglicemia e complicações vasculares (INZUCCHI, 2007).

As anormalidades fisiopatológicas relacionadas com o Diabetes *Mellitus* tipo 2 incluem a deficiência na secreção insulínica, a saída excessiva de glicose hepática e a resistência

insulínica no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. O tratamento para esta condição consiste no alívio dos sintomas através da normalização dos níveis de glicose sanguínea e da prevenção das complicações, portanto, medidas farmacológicas e não-farmacológicas são empregadas. A instrução sobre esta condição, bem como o controle dietético e a prática de atividade física são imprescindíveis para a redução dos sintomas. Entretanto, agentes farmacológicos pertencentes a quatro classes podem ser utilizados para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2, agindo nos principais sítios de defeitos, sendo: pelo aumento da disponibilidade de insulina; pela supressão da excessiva liberação de glicose hepática; pelo aumento da sensibilidade à insulina; e pelo retardo da absorção da glicose gastrointestinal, sendo este último alcançado pela ingestão de inibidores de α -glicosidase (INZUCCHI, 2007).

Os agentes farmacológicos apresentam diversos efeitos colaterais, como hipoglicemia, ganho de peso, anorexia, náuseas e vômitos, gosto metálico e problemas gastrointestinais, incluindo desconforto abdominal, flatulência e diarreia (INZUCCHI, 2007). Levando isto em consideração, estudos têm sido realizados com o intuito de buscar a descoberta de agentes antiglicêmicos, objetivando a redução dos níveis de glicose sanguínea pós-prandial sem a presença de qualquer efeito colateral (MCCUE; KWON; SHETTY, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2014).

McCue; Kwon e Shetty (2005), avaliaram o potencial antidiabético de extratos aquosos de diferentes matrizes vegetais americanas e asiáticas como fontes de inibidores de α -amilase e α -glicosidase e observaram que para os alimentos americanos, os extratos de uva vermelha, pimenta verde fresca, brotos de brócolis e cenoura fresca apresentaram maiores inibições de α -amilase (valor de índice de IA de $2,2 \pm 0,4$; $1,8 \pm 0,2$; $1,8 \pm 0,3$; $1,7 \pm 0,3$, respectivamente). Comparativamente, os extratos de alimentos asiáticos com maiores índices foram o extrato de gengibre, coccinia, mostarda e canela (valor de índice IA = $2,7 \pm 0,5$; $2,4 \pm 0,6$; $2,0 \pm 0,4$; $1,8 \pm 0,4$, respectivamente). Enquanto para a análise de inibição de α -glicosidase, apenas os extratos americanos de biscoito cracker *Wheat Thins* ($1,1 \pm 0,01$), uva vermelha ($1,04 \pm 0,003$), broto de brócolis ($1,04 \pm 0,01$) e vagem ($1,04 \pm 0,01$) apresentam índices de inibição, enquanto para as amostras asiáticas, os extratos de canela ($1,19 \pm 0,03$), feno-grego ($1,09 \pm 0,01$), pó de erva-doce ($1,04 \pm 0,01$) e gengibre ($1,02 \pm 0,02$) apresentaram atividade inibitória. Logo, incluir estes alimentos na dieta pode ser uma alternativa para auxiliar no controle da glicemia pós-prandial devido a modulação da metabolização dos carboidratos.

Extratos obtidos da casca do pinhão de *Araucaria angustifolia* foram relacionados com a inibição de α -amilases salivares humanas e α -amilases pancreáticas suínas, sendo também eficazes na redução dos níveis de glicose sanguínea de ratos após a administração de amido. As

evidências indicam que as propriedades bioativas observados provavelmente estão relacionados à fração de taninos presentes nesta matriz vegetal (SILVA *et al.*, 2014). O método utilizado para obtenção dos extratos fenólicos influencia nos teores e perfil fenólico e, conseqüentemente, nas propriedades bioativas que estes extratos desempenham. A título de exemplo, o extrato obtido por meio da extração com etanol das cascas residuais de pinhão apresentou maior atividade antioxidante e melhor inibição de α -amilases pancreáticas salivares humanas e suínas quando comparado ao extrato obtido da água de cocção (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Portanto, alimentos ricos em compostos fenólicos, principalmente flavonoides podem ser uma alternativa para redução e controle da hiperglicemia pós-prandial. Segundo Moradi-Afrapoli *et al.* (2012), a substituição da hidroxila na molécula do flavonoide influencia na atividade inibitória da α -glicosidase, de tal forma que o aumento do número de grupos fenólicos livres resulta em maior atividade. A título de comparação, os compostos N-trans-cafeoil-tiramina, miricitrina e (-) galocatequina tiveram maior atividade inibitória ($IC_{50} = 0,3; 0,6$ e $1,0 \mu M$, respectivamente), maiores inclusive que a acarbose ($IC_{50} = 13,5 \mu M$), um fármaco utilizado no tratamento de Diabetes Mellitus como inibidor de α -glicosidase.

1.5 ATIVIDADE DE CITOTOXICIDADE CELULAR

A citotoxicidade é fundamentada nos efeitos da substância-teste em relação às alterações nos parâmetros específicos bioquímicos ou fisiológicos e integridade e crescimento celular. Muitos métodos *in vitro* têm sido aplicados para avaliação da atividade de citotoxicidade celular, como: citotoxicidade pelo método de contato direto e eluição; citotoxicidade pelo método de difusão em ágar; citotoxicidade pelo método da captura do vermelho-neutro (NRU)/MTT; citotoxicidade pelo teste em células de ovário de hamster chinês; citotoxicidade pelo teste de liberação do $^{51}Cromo$; citotoxicidade pelo teste com macrófagos alveolares de coelhos, entre outros (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Embora o consumo de flavonoides resulte em benefícios à saúde, estudos têm verificado atividade mutagênica e de genotoxicidade, possivelmente relacionados com sua atividade pró-oxidante, quando em grandes concentrações, resultando na formação de radicais livres capazes de danificar o DNA ou inibindo enzimas associadas ao DNA. Quebras de fita de DNA e mutações podem ocorrer devido a danos oxidativos não devidamente restaurados, os quais podem resultar em lesões pré-neoplásicas não reversíveis (SKIBOLA; SMITH, 2000; SUZUKI *et al.*, 1991; POPP; SCHIMMER, 1991; JURADO *et al.*, 1991; BREIMER, 1990).

Portanto, investigar os níveis seguros de ingestão destes compostos torna-se imprescindível para garantir a segurança do extrato a ser adicionado aos alimentos.

Oliveira *et al.* (2021), avaliaram a citotoxicidade de extratos de *Araucaria angustifolia* obtidos a partir da água de cocção e pela extração com etanol das cascas de pinhão, de modo que somente este último extrato apresentou atividade citotóxica para as linhagens tumorais humanas estudadas, sendo o mais eficaz contra carcinoma hepatocelular, possivelmente devido seu maior teor em catequina, quando comparado ao extrato obtido da água de cocção. Ademais, nenhum efeito adverso foi observado com relação às células saudáveis de fígado suíno, atestando que ambos extratos não apresentam efeitos citotóxicos contra células não tumorais.

1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE BASEADA EM CÉLULAS

Os compostos fenólicos, como os flavonoides, são estudados devido sua propriedade doadora de um elétron, atuando como antioxidantes em cultura de células *in vitro* ou em células, eliminando o ânion superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxidos lipídicos e/ou radicais livres. Esta propriedade tem incentivado pesquisadores a investigar novas fontes de compostos fenólicos e sua ação antioxidante, principalmente no âmbito celular, uma vez que a oxidação do DNA possivelmente pode ser uma das potenciais causas de mutações, as quais podem ser reduzidas através destes antioxidantes dietéticos, auxiliando na prevenção de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

Os radicais livres, quando em excesso no organismo, apresentam efeitos prejudiciais à saúde, como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, encontrando-se dessa forma relacionados com patologias como câncer, doenças do sistema cardiovascular, disfunções cognitivas, doenças degenerativas e neurológicas. Com o objetivo de neutralizar os efeitos nocivos, os organismos produzem substâncias com capacidade de regeneração ou prevenção dos danos oxidativos, por meio de sua ação antioxidante. Ainda, compostos com ação antioxidante, devido sua aptidão em atuar como sequestradores de radicais livres, podem ser obtidos por meio da alimentação (ALVES *et al.*, 2010).

1.7 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

O câncer está entre as doenças que mais levam a morte no mundo. As estimativas do Observatório Global de Câncer (GCO) indicaram que haveriam 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes decorrentes da doença no ano de 2018. Ainda, destacam em

seu relatório que o câncer é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, independentemente do nível de desenvolvimento humano (BRAY *et al.*, 2018). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), 309.750 e 316.280 novos casos de câncer foram diagnosticados em 2020 para homens e mulheres, respectivamente. Com relação à localização primária do tumor, em homem o câncer de próstata obteve o maior índice (29,2%), seguido de cólon e reto (9,1%), traqueia, brônquio e pulmão (7,9%), já para mulheres, o câncer de mama feminina obteve o maior índice (29,7%), seguido por cólon e reto (9,2%) e colo do útero (7,5%).

Estudos epidemiológicos revelaram que hábitos de vida saudáveis, incluindo uma dieta balanceada e a prática de atividade física, podem contribuir na prevenção de tipos específicos de câncer. Tabagismo, consumo de álcool e excesso de peso corpóreo são alguns fatores relacionados com o risco de desenvolver câncer colorretal. Portanto, a quimioprevenção do câncer abrange a utilização de agentes naturais ou biológicos com ação inibitória ou para reverter o crescimento do tumor, sendo os fitoquímicos naturais uma alternativa como tratamento preventivo (ALEKSANDROVA *et al.*, 2014; KOTECHEA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2021), a carcinogênese é estabelecida devido a exposição à agentes cancerígenos, em determinada frequência e período de tempo, sendo composto por três estágios: iniciação, promoção e progressão. No estágio de iniciação, os agentes cancerígenos provocam modificações em alguns genes e se encontram iniciadas para a ação do segundo grupo de agentes oncopromotores que atuarão no estágio de promoção, onde ocorrerá transformação da célula iniciada em célula maligna, de modo lento e gradual. O estágio de progressão é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas nos estágios anteriores, ocorrendo pela ação de agentes oncoaceleradores, resultando na instalação do câncer, o qual evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Os mecanismos pelos quais as frutas e vegetais ricos em compostos fenólicos podem auxiliar na prevenção da carcinogênese incluem a inativação de carcinógenos, parada do ciclo celular, indução da apoptose e diferenciação, antiproliferação, inibição da angiogênese, antioxidação (REN *et al.*, 2003). Quando a proliferação celular ocorre de forma desregulada pode resultar em um aumento da suscetibilidade à neoplasia. Portanto, a prevenção normalmente é realizada pela inibição, reversão ou retardo da hiperproliferação celular. Dentre os fitoquímicos naturais, os flavonoides provenientes da dieta apresentam atividade inibitória de crescimento celular, inibindo a proliferação em muitos tipos de linhagens celulares

cancerosas humanas sem apresentar efeitos tóxicos para células normais, nas concentrações estudadas (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

1.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação consiste em uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares, onde o agente responsável pode ser de natureza química, física ou biológica. A reação inflamatória consiste na identificação do estímulo causador da lesão, com posterior destruição e tentativa reparar os danos no tecido afetado (NATHAN, 2002; ZHOU *et al.*, 2007). Entretanto, quando esta resposta inflamatória ocorre de forma excessiva e prolongada, pode desencadear desordens no organismo, que por sua vez, podem resultar em diabetes, aterosclerose, doenças de Alzheimer e reumáticas (SERHAN; CHIANG, 2004).

De acordo com Câmara (2013), o processo inflamatório pode ser dividido nas fases irritativa, vascular, exsudativa, degenerativa-necrótica e produtiva-reparativa; a fase irritativa é caracterizada pelo surgimento de modificações morfológicas e funcionais dos tecidos lesionados, ocorrendo liberação de mediadores químicos, que por sua vez são responsáveis por desencadear as fases seguintes da inflamação. Na fase vascular ocorrem modificações hemodinâmicas da circulação e da permeabilidade vascular no local da lesão e, em seguida, na fase exsudativa, são formados exsudados celular e plasmático, ou seja, ocorre a migração de líquidos e células para o foco inflamatório. A fase seguinte consiste na fase degenerativa-necrótica, sendo esta composta por células com alterações degenerativas, reversíveis ou não, derivadas da ação direta do agente agressor e/ou das modificações funcionais das fases anteriores. Na última fase, a fase produtiva-reparativa, tem como objetivo a destruição do agente agressor e reparação do tecido lesionado, sendo caracterizada pelo aumento da quantidade dos elementos teciduais.

Estudos realizados com matrizes vegetais demonstram que determinados fitoquímicos desempenham atividade anti-inflamatória, podendo ser uma alternativa mais natural para tratamento (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2019). Compostos fenólicos da subclasse dos flavonoides foram relacionados com essa propriedade anti-inflamatória, pelos seguintes mecanismos de ação: inibição da síntese de Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α); bloqueio das enzimas fosfolipase, lipoxigenases ou COX 1 e 2; redução da adesão de células inflamatórias no endotélio vascular; inibição da elastase neutrofílica humana (HNE) e metaloproteinases da matriz (REGINATO; SILVA; BAUERMANN, 2015).

O extrato de epicarpo de jabuticaba foi anteriormente associado à atividade anti-inflamatória, uma vez que apresentou capacidade inibitória no crescimento de macrófagos de camundongo e para doença pulmonar obstrutiva crônica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2019). Polifenóis provenientes do cacau apresentaram notável atividade por meio da modulação de marcadores inflamatórios envolvidos na aterosclerose, de modo que o consumo de cacau e seus derivados são relacionados com menores riscos de mortalidade por doenças cardiovasculares (KHAN *et al.*, 2014). De acordo com Coutinho *et al.* (2009), a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, o número e a posição dos grupamentos hidroxila e a não glicosilação da molécula dos flavonoides são fatores que influenciam na atividade anti-inflamatória desempenhada por essa classe de composto fenólico.

1.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Posteriormente à análise da literatura e apresentação de informações sobre a composição fenólica, atividades antioxidante e antimicrobiana dos compostos presentes nas brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*, o grande interesse por esta matéria-prima fica evidente. Uma série de estudos demonstram que os flavonoides apresentam atividade antimicrobiana por diferentes mecanismos de ação, sendo estes compostos possíveis de serem recuperados da matriz vegetal e incorporados a alimentos, objetivando o aumento da vida útil pela inibição do desenvolvimento de microrganismos contaminantes e patogênicos, bem como elevar a atividade antioxidante dos produtos adicionados de extratos fenólicos. Além disso, atividades como antioxidante celular, antiproliferativa e anti-inflamatória observadas no extrato estão relacionadas com seu perfil fenólico, de modo a possivelmente ser uma alternativa para auxiliar na proteção contra o desenvolvimento de doenças degenerativas.

CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BRÁCTEAS ESTÉREIS DE *Araucaria angustifolia*

RESUMO

As brácteas estéreis consistem em uma rica fonte de compostos fenólicos, os quais podem ser recuperados e aplicados em produtos alimentícios, objetivando o aumento do teor de compostos bioativos, atividades antioxidante, antimicrobiana e propriedades funcionais como antiglicêmica, anti-inflamatória e antiproliferativa. Portanto, avaliar as condições utilizadas na extração torna-se imprescindível para otimizar o processo, o que pode ser realizado utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Ensaios de extração foram realizados avaliando o efeito da concentração de etanol (20, 40 e 60%), utilizado como solvente, temperatura (30, 55 e 80 °C) e razão soluto/solvente (1:10, 1:25 e 1:40). A caracterização fenólica foi realizada por meio da quantificação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados, enquanto a quantificação e identificação de compostos fenólicos individuais foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH (captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina)-6-sulfônico). Os resultados demonstraram que as condições otimizadas foram obtidas com etanol 60% (v/v), com razão soluto/solvente de 1:38 (p/v) e à temperatura de 80 °C. Os compostos observados no extrato foram o ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol, os quais estão relacionados com propriedades bioativas.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Metodologia de Superfície de Resposta. CLAE.

2.1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera encontrada principalmente na região sul do Brasil, podendo atingir 35 m de altura e 1,2 m de diâmetro e, de acordo com registros fósseis, o gênero *Araucaria* aparece estabelecido no período Jurássico, entre 199 e 145 milhões de anos (APREMAVI). A estrutura reprodutiva da *Araucaria* é composta por estróbilos masculino e feminino. Após a fecundação, as sementes e brácteas (sementes estéreis) encontram-se nos estróbilos femininos (pinha madura) (BRANCO *et al.*, 2016; CARVALHO, 2002). As sementes, conhecidas como “pinhão”, são ricas em amido e aminoácidos, sendo consumidas cozidas ou assadas (BENINCA *et al.*, 2019). As brácteas correspondem a cerca de 80% da pinha e permanecem no solo quando as pinhas maduras caem ou são retiradas das árvores pelos animais (MICHELON *et al.*, 2012).

As brácteas, matriz rica em compostos fenólicos, apresenta como principais subclasses fenólicas os flavan-3-ols (catequina, epicatequina e apigenina) e os flavonóis (glicosídeos de quercetina). Estudos mostram que compostos fenólicos obtidos de brácteas de *Araucaria*

angustifolia apresentam alta atividade antioxidante e antígeno-tóxica (MICHELON *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014).

A extração de compostos bioativos pode ser influenciada por diversos fatores, como solvente utilizado, tempo de extração e temperatura, método utilizado, agitação, relação soluto/solvente, além das características intrínsecas da amostra, como a natureza química da amostra. A fim de otimizar o processo de extração, os parâmetros citados acima são estudados, utilizando por exemplo, a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), para obter melhores rendimentos durante o processo de extração dos compostos fenólicos (HAMINIUK *et al.*, 2012). A Metodologia de Superfície de Resposta, além de permitir a otimização das condições da extração, permite a avaliação dos efeitos das variáveis e suas interações (FARRIS; PIERGIOVANNI, 2009; WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999). Os solventes mais comuns usados na extração desses compostos são o metanol, a acetona e suas misturas com água, porém esses produtos apresentam toxicidade não sendo totalmente eliminados na etapa de remoção do solvente. Portanto, quando objetiva-se a aplicação do extrato em produtos alimentícios, o solvente selecionado deve ser grau alimentício (BENVENUTTI *et al.*, 2019; PINELO *et al.*, 2005).

Desta forma, este capítulo tem como objetivo otimizar a extração de compostos fenólicos das brácteas estéreis da *Araucaria angustifolia*, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

As brácteas estéreis de pinhão (*Araucaria angustifolia*) (Figura 6), foram coletadas (logo após queda natural das árvores) na região dos Campos Gerais, a partir de pinhas maduras. Para obtenção do extrato fenólico, foi utilizado etanol (99,5%) (Biotec, PR, Brasil) em diferentes concentrações para realizar a extração dos compostos de interesse.

Figura 6 – *Araucaria angustifolia* (1), pinhas (2), pinhões (3) e brácteas estéreis (4).



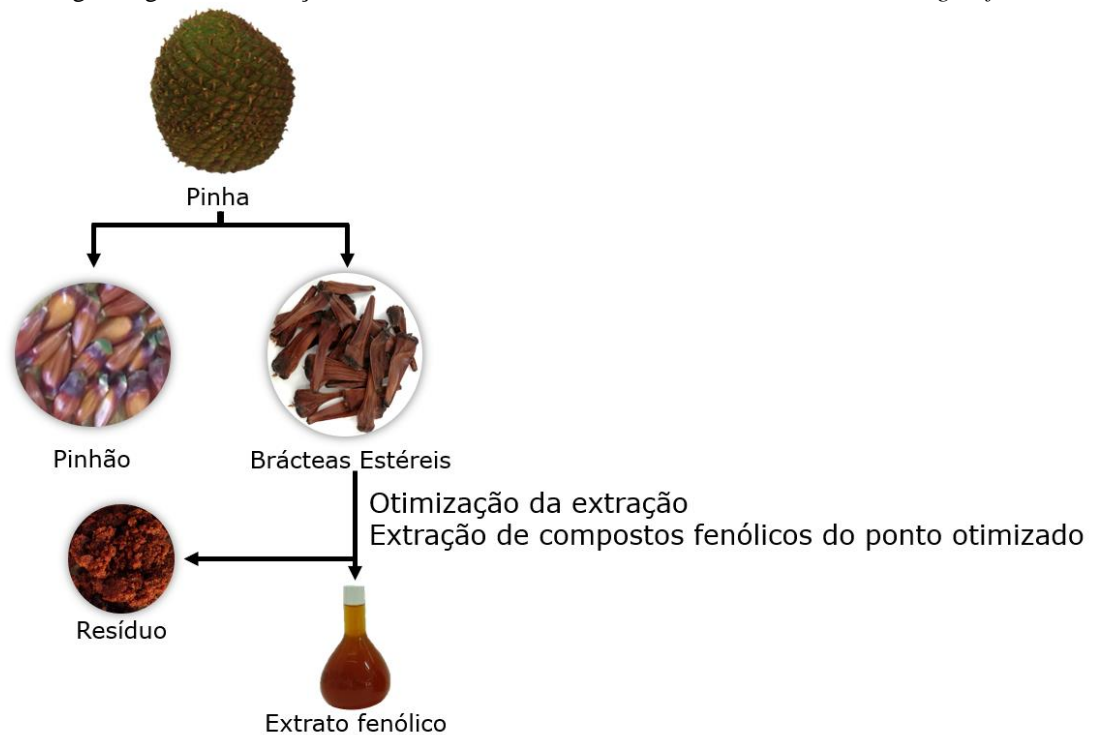
Fonte: A autora.

Foram utilizados os reagentes Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil), ácido gálico, (+)- catequina e quercetina, os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O hidróxido de sódio, metanol, acetato de sódio e ácido clorídrico foram obtidos da Biotec (PR, Brasil). O nitrito de sódio e vanilina foram adquiridos da Química Moderna (SP, Brasil). O cloreto de alumínio e o persulfato de potássio da Synth (SP, Brasil) e o carbonato de sódio foi adquirido da Anidrol (SP, Brasil). As soluções aquosas foram preparadas com água destilada ou ultrapura (Milli-Q, Millipore, Brasil).

2.2.2 Métodos

O fluxograma geral dos métodos desenvolvidos para obtenção do extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* é apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma geral de obtenção do extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.



Fonte: A autora.

2.2.2.1 Obtenção do extrato fenólico

Previamente a etapa de extração, as brácteas estéreis ($29,41 \pm 0,66$ % de umidade), oriundas de pinhas de *Araucaria angustifolia*, foram submetidas ao processo de desidratação em estufa com circulação e renovação de ar (modelo TE-394/2, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) a uma temperatura de 50°C por um período de 24 horas. Posteriormente, passaram por um processo de cominuição (liquidificador industrial modelo LS-06, Brusque, SC, Brasil; moinho modelo TECMILL R-TE-633, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil), seguido pela tamisação com peneiras de 40 a 60 mesh, obtendo partículas com tamanho entre 0,42 e 0,250 mm.

A fim otimizar o processo e avaliar os efeitos da concentração da solução de etanol (20, 40 e 60%), temperatura (30, 55 e 80°C) e razão soluto/solvente (1:10, 1:25 e 1:40) foi realizado um planejamento experimental Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960). Para cada ensaio, foram utilizados 2 g da amostra tamisada que ficou em contato com o solvente por um tempo de 20 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada ($2224 \times g$ por 15 min a 25°C , centrífuga modelo MPW-351, MPW MED. INSTRUMENTS, 600W, Varsóvia, Polônia) e o sobrenadante recuperado foi rotaevaporado (evaporador rotativo modelo TE-211, TECNAL,

Piracicaba, SP, Brasil) a 50°C para remoção do solvente e, posteriormente, o volume ajustado para 50 mL com água destilada.

2.2.2.2 Planejamento experimental

Um planejamento Box-Behnken (1960) para o solvente utilizado foi desenvolvido visando analisar os parâmetros de extração e realizar a otimização das condições ótimas de extração dos compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*. O resultado das variáveis independentes concentração de solvente (X_1), razão soluto/solvente (X_2) e da temperatura de extração (X_3), em três níveis, foram analisados no processo de extração (Tabela 2). Quinze experimentos foram realizados para avaliar o padrão de resposta e desenvolver modelos para a extração de compostos fenólicos, com soluções de etanol, sendo todos os experimentos realizados de modo aleatório.

Tabela 2 - Planejamento Box-Behnken aplicado para a extração de compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

Experimento	Fatores		
	Concentração (%)	Razão	Temperatura (°C)
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
Valores reais *	Etanol		
-1	20	10	30
0	40	25	55
+1	60	40	80

Nota: * Valores adotados para cada fator nos experimentos de extração de compostos fenólicos.

Uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 1), foi adotada para ajustar os dados experimentais das variáveis estudadas.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

onde Y é a resposta predita, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para a interseção, linear, quadrático e de interação, respectivamente, e X_i e X_j são as variáveis independentes (BRUNS; SCARMINO; BARROS NETO, 2006).

A importância estatística dos termos nas equações de regressão foi analisada por análise de variância (ANOVA) para cada resposta. Os termos que não apresentaram efeitos estatísticos significativos foram deletados do modelo inicial e os dados experimentais foram rearranjados apenas para os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$). Os parâmetros otimizados para as variáveis independentes foram ainda aplicados para validar o modelo, utilizando os mesmos métodos experimentais usados anteriormente, a fim de confirmar o poder de previsão dos modelos pela contraposição dos dados preditos com os dados experimentais. As amostras para otimização foram feitas em triplicata e em seguida analisadas.

2.2.2.3 Caracterização fenólica

A caracterização fenólica do extrato foi realizada por meio da quantificação do teor de compostos fenólicos totais (SINGLETON; ROSSI, 1965), flavonoides totais (ZHISHEN; MENGEHENG; JIANMING, 1999), flavonóis (KUMARAN; KURUNAKARAN, 2007) e taninos condensados (BROADHURST; JONES, 1978).

A análise de compostos fenólicos totais foi realizada por meio de método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EUA). Em tubos foram adicionados 8,4 mL de água destilada, 100 μ L de amostra e 500 μ L de reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes) e então os tubos foram agitados (vórtex mixer, KMC-1300 V, VISION SCIENTIFIC CO., LTD, Yuseong-Gu, Daejeon-Si, Korea) e mantidos em repouso por 3 minutos. Após transcorrido o tempo, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio (20%). Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos no escuro por 1 hora. Após transcorrido o tempo, 300 μ L foram transferidos para uma microplaca de 96 poços (TPP, modelo 920, com capacidade de 300 μ L) e a absorbância foi medida em leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) no comprimento de onda de 720 nm. As absorbâncias foram comparadas com uma curva de calibração de ácido gálico ($y = 0,000855x - 0,001833$; $R^2 = 0,996878$) e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico por grama de amostra.

Para a quantificação de flavonoides totais foram adicionados em tubos 2 mL de água destilada, 250 μ L de amostra e 120 μ L de solução de nitrito de sódio (0,5 mol/L), os tubos foram agitados em vórtex e mantidos em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 120 μ L de cloreto de alumínio (10%). Os tubos foram novamente agitados em vórtex e mantidos em repouso por 5 minutos e então foram adicionados 800 μ L de hidróxido de sódio (1 mol/L), sendo os tubos novamente agitados em vórtex. Foram transferidos 300 μ L para uma microplaca e as absorbâncias foram medidas em leitor de microplaca a 510 nm e comparadas com uma

curva de calibração de catequina ($y = 0,004028x + 0,019993$; $R^2 = 0,996608$) e os resultados expressos em miligramas de catequina por grama de amostra.

Para a quantificação do teor de flavonóis foram adicionados a uma microplaca de 96 poços, 30 μL de amostra e 60 μL de cloreto de alumínio (20 mg/mL), a microplaca foi agitada (BioTek Absorbance Microplate Reader – Elx808, USA) e então foram adicionados 150 μL de acetato de sódio (50 mg/mL) e então agitada novamente e mantida ao abrigo da luz por 2 horas e 30 minutos. Após transcorrido o tempo de reação, foi realizada a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 440 nm, sendo estas comparadas com uma curva de calibração de quercetina ($y = 0,006531x + 0,003679$; $R^2 = 0,998025$) e as concentrações expressas em miligramas de quercetina por grama de amostra.

Os taninos condensados foram quantificados por meio do método da vanilina, onde em tubos foram adicionados 250 μL de amostra e 1500 μL de solução de vanilina (4% p/v, em metanol). Os tubos foram agitados em vórtex e em seguida, foram adicionados 750 μL de ácido clorídrico concentrado e novamente submetidos ao processo de agitação em vórtex. Os tubos foram armazenados ao abrigo da luz por 15 minutos. Transcorrido o tempo de reação, 300 μL foram transferidos para uma microplaca e as absorbâncias foram medidas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 500 nm e estas foram comparadas com uma curva de calibração de catequina ($y = 0,002608x + 0,019126$; $R^2 = 0,996488$), onde os teores foram expressos em miligramas de catequina por grama de amostra.

2.2.2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada utilizando a metodologia de eliminação do radical DPPH, proposto por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) e pelo método de captura do radical ABTS, desenvolvido por Re *et al.* (1999).

A atividade antioxidante pelo método de DPPH foi realizada adicionando 50 μL de amostra e 250 μL de reagente DPPH (125 $\mu\text{mol/L}$), preparado em metanol, em microplaca contendo 96 poços. A microplaca foi submetida a agitação (BioTek Absorbance Microplate Reader – Elx808, USA) e mantida ao abrigo da luz por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas utilizando o comprimento de onda de 517 nm, sendo estas comparadas com uma curva de calibração de Trolox (TE) ($y = 0,069668x + 3,877216$; $R^2 = 0,992726$) e os resultados expressos como $\mu\text{mol TE/g}$.

Para avaliar a capacidade de captura do radical ABTS, primeiramente foi preparada o reagente ABTS⁺, onde foram misturados uma solução de ABTS (7 mmol/L) com uma solução

de persulfato de potássio (2,45 mmol/L) na proporção de 1:1. Após a mistura, esta solução foi mantida ao abrigo da luz por 16 horas. Após transcorrido o tempo, foram transferidos 4 mL da solução para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi ajustado utilizando água destilada, sendo que a absorbância da solução deve ser superior a 0,7, no comprimento de onda de 734 nm. Utilizando uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 µL de amostra e 280 µL da solução de ABTS⁺ corrigida, e posteriormente a microplaca foi agitada (BioTek Absorbance Microplate Reader – Elx808, USA) e mantida ao abrigo da luz por 30 minutos. Após transcorrido o tempo de reação, as absorbâncias foram medidas utilizando o comprimento de onda de 734 nm. As leituras foram comparadas com uma curva de calibração de Trolox ($y = 0,229710x - 18,307398$; $R^2 = 0,970656$) e os resultados expressos como µmol TE/g.

2.2.2.5 Compostos fenólicos individuais

A quantificação de compostos fenólicos individuais foi realizada utilizando as condições ótimas de extração utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Foram quantificados os teores de ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina, rutina e kaempferol por meio da comparação dos tempos de retenção e espectro dos padrões. Foi utilizado um sistema cromatográfico 2695 Alliance (Waters, EUA), com bomba quaternária, amostrador automático e detector de matriz de fotodiodos PDA 2998 (Waters, EUA). As fases móveis foram compostas por 1% de ácido acético (A) e acetonitrila (B) de acordo com o seguinte gradiente de eluição: 3-15% B (0-30 min), 15-40% B (30-40 min), 40-75% B (40-45 min), seguido por uma eluição isocrática a 85% B (5 min) e acondicionamento da coluna (10 min). A separação ocorrerá em coluna Gemini C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Phenomenex, EUA) a 20°C, com taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

2.2.2.6 Cor do extrato

A cor das amostras foi verificada a partir de colorímetro digital (Konica Minolta, CM 5, Japão), com obtenção dos valores de luminosidade (L^*), coordenada vermelho/verde (a^*) e coordenada amarelo/azul (b^*), os quais foram utilizados para calcular os valores de Chroma (C^*) (Equação 3) e ângulo hue (h^*) (Equações 4 e 5), os quais representam a intensidade de cor e a tonalidade, respectivamente.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*), \text{ quando } a^* > 0 \quad (3)$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) + 180^\circ, \text{ quando } a^* < 0 \quad (4)$$

2.2.2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises descritas neste trabalho foram expressos como a média seguida do desvio padrão amostral. As diferenças significativas ($p < 0,05$) dos valores médios foram avaliadas utilizando análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Fisher LSD. Todos os tratamentos estatísticos foram realizados utilizando o software STATISTICA 7.1 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Otimização da Extração de Compostos Fenólicos

Os resultados da quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados e atividade antioxidante por DPPH e ABTS dos extratos são apresentados na Tabela 3. Os modelos para cada variável de resposta sugeridos pelo método de regressão linear múltipla demonstraram significância no nível de confiança de 95% ($p < 0,01$) sem falta de ajuste ($p_{\text{lack of fit}} > 0,05$). Esses modelos apresentaram boa concordância com os dados experimentais ($R^2 > 0,89$), e os valores ajustados de R^2 foram capazes de explicar de 84% a 98% da variação dos dados (Tabela 4). Os gráficos de superfície de resposta que demonstram os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes são apresentados na Figura 8.

Tabela 3 - Compostos fenólicos totais (TPC), flavonoides totais (TFC), taninos (TAN) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

Experimento	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CTE/g)	TAN (mg CTE/g)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$)
1	3,57 ^h ± 0,12	2,10 ^l ± 0,05	2,17 ⁿ ± 0,11	22,30 ^g ± 1,47	28,09 ⁱ ± 1,21
2	4,64 ^g ± 0,28	3,14 ^{ij} ± 0,15	4,83 ⁱ ± 0,19	23,30 ^g ± 0,85	33,44 ^h ± 0,85
3	6,89 ^e ± 0,44	4,29 ^h ± 0,08	4,03 ^j ± 0,13	31,48 ^f ± 3,05	52,34 ^{ef} ± 1,60
4	8,66 ^b ± 0,42	5,68 ^c ± 0,10	9,40 ^c ± 0,38	54,89 ^c ± 2,60	73,32 ^b ± 1,62
5	4,92 ^g ± 0,20	3,03 ^j ± 0,08	2,97 ^l ± 0,13	22,20 ^g ± 3,16	32,58 ^h ± 0,67
6	7,46 ^{cd} ± 0,37	4,88 ^{def} ± 0,07	7,44 ^d ± 0,32	45,88 ^d ± 1,08	50,65 ^f ± 1,80
7	7,86 ^c ± 0,12	4,81 ^{efg} ± 0,16	6,95 ^e ± 0,28	45,64 ^d ± 1,41	53,08 ^e ± 0,49
8	9,27 ^a ± 0,31	6,05 ^b ± 0,18	10,56 ^a ± 0,30	60,55 ^b ± 1,34	74,22 ^b ± 2,03
9	3,77 ^h ± 0,15	2,12 ^l ± 0,09	2,60 ^m ± 0,13	15,57 ^h ± 1,15	28,13 ⁱ ± 0,77
10	7,24 ^{de} ± 0,22	4,57 ^g ± 0,10	5,23 ^{gh} ± 0,23	37,97 ^e ± 1,18	53,51 ^e ± 2,03
11	5,76 ^f ± 0,27	3,36 ⁱ ± 0,05	5,00 ^{hi} ± 0,09	29,55 ^f ± 0,98	41,13 ^g ± 1,28
12	9,48 ^a ± 0,34	6,57 ^a ± 0,25	10,26 ^b ± 0,22	68,69 ^a ± 3,56	77,40 ^a ± 2,05
13	7,59 ^{cd} ± 0,22	4,94 ^{de} ± 0,14	6,18 ^f ± 0,14	43,12 ^d ± 1,98	50,49 ^f ± 2,16
14	7,37 ^d ± 0,16	4,66 ^{fg} ± 0,21	5,51 ^g ± 0,19	38,80 ^e ± 2,56	57,30 ^d ± 0,41
15	7,81 ^c ± 0,37	5,09 ^d ± 0,28	6,39 ^f ± 0,21	44,22 ^d ± 1,55	64,11 ^c ± 1,78
p *	0,70	0,49	0,08	0,31	0,49
p **	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: GAE: equivalente de ácido gálico; CTE: equivalente de catequina; TE: equivalente de Trolox; *: p (Cochran); **: p (ANOVA).

Os parâmetros concentração de solvente, relação soluto/solvente e temperatura influenciaram positivamente a extração dos fenóis totais, enquanto o coeficiente de regressão quadrática de concentração e relação soluto/solvente apresentaram influência negativa.

A concentração de solvente apresentou coeficientes de regressão linear positivos, indicando que este parâmetro influenciou positivamente na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante, principalmente para os taninos. Porém, apresentou resposta quadrática negativa para fenóis totais, indicando que a concentração intermediária resulta em maior rendimento de extração. A concentração do solvente está diretamente relacionada à afinidade dos compostos com o solvente, ou seja, um extrato obtido com uma baixa concentração de etanol contém um maior teor de compostos hidrofílicos, enquanto que ao utilizar uma alta concentração de etanol, o extrato será rico em compostos lipofílicos (DURLING *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Muitos estudos relatam que o uso de um sistema binário de solventes resulta em maior extração de compostos fenólicos quando comparado ao sistema monossolvente (água ou etanol puro) (THOO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2007). Uma mistura entre solvente e água tem um efeito maior na extração do que o próprio solvente puro, pois, ao adicionar água ao solvente, ela não se torna tão seletiva, extraíndo mais compostos (SPIGNO; TRAMELLI; FAVERI, 2007).

Em relação à razão soluto/solvente, os coeficientes de regressão linear mostram que esse parâmetro influencia positivamente na extração de compostos fenólicos da amostra, enquanto os coeficientes de regressão quadrática apresentaram resposta significativa com efeito negativo. Quanto maior a razão solvente/sólido, maior será o rendimento de extração, de acordo com os princípios de transferência de massa, que incluem a força motriz durante a transferência de massa é o gradiente de concentração entre o sólido e a massa de solvente, que é maior quando uma razão solvente/sólido mais alta é usada (PINELO *et al.*, 2005). De acordo com o modelo, o maior rendimento será obtido com a relação soluto/solvente de 1:40 (p/v).

Para a temperatura, os coeficientes de regressão linear mostram influência significativa, com efeito positivo. A temperatura aumenta a solubilidade dos compostos fenólicos, visto que o aumento da temperatura facilita a separação do polifenol por quebrar os constituintes celulares da matriz vegetal, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana celular facilitando assim a penetração do solvente (WANG *et al.*, 2008). Os maiores rendimentos foram observados na temperatura de 80°C. Esta temperatura pode ser utilizada, uma vez que a atividade antioxidante não foi alterada significativamente nos testes a 80°C, mostrando que esses compostos resistem a essas temperaturas no período de tempo testado, sem perder suas características. Este resultado está de acordo com outros trabalhos (SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007; PINELO *et al.*, 2005; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005), nos quais indicam que o rendimento da extração de compostos fenólicos aumenta com o aumento da temperatura.

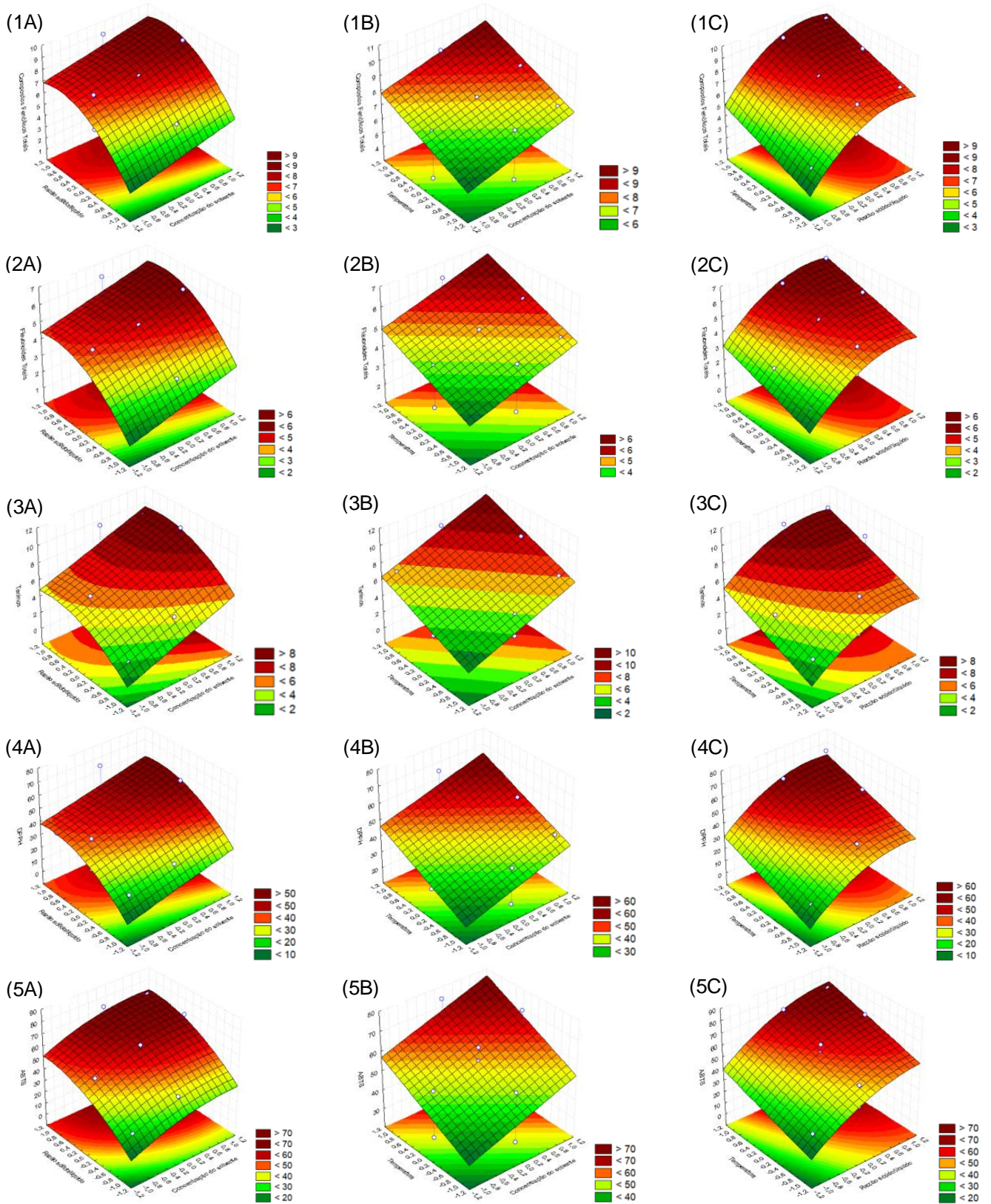
Os compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos apresentaram correlação significativa ($p \leq 0,05$) com a atividade antioxidante pelo método DPPH ($r = 0,95$; $r = 0,97$; $r = 0,96$, respectivamente) e pelo método ABTS ($r = 0,97$; $r = 0,97$; $r = 0,91$, respectivamente). Vários estudos demonstram uma correlação positiva entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (ALBERTI *et al.*, 2014; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; SOUZA *et al.*, 2014; THOO *et al.*, 2010), o que pode ser explicado devido a capacidade redox que esses compostos, mais especificamente flavonoides, têm (ALBERTI *et al.*, 2014).

Tabela 4 - Efeitos das variáveis independentes (concentração de solvente, razão soluto/solvente e temperatura) para avaliação das variáveis dependentes utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.

Variável resposta	Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor <i>t</i>	Valor <i>p</i>	-95% confiança	+95% confiança
Compostos fenólicos totais (mg/g)	Constante	7,71	0,15	50,85	<0,001	7,37	8,06
	X ₁	0,85	0,11	7,59	<0,001	0,59	1,10
	X ₁ ²	-0,43	0,16	-2,63	0,03	-0,80	-0,06
	X ₂	1,81	0,11	16,24	<0,001	1,56	2,07
	X ₂ ²	-1,25	0,16	-7,61	<0,001	-1,62	-0,88
	X ₃	1,12	0,11	10,06	<0,001	0,87	1,38
	R ²	0,98					
	R ² ajustado	0,97					
	Valor <i>p</i> (modelo)	<0,001					
	Valor <i>p</i> (<i>lack of fit</i>)	0,33					
Flavonoides totais (mg/g)	Constante	4,78	0,11	43,35	<0,001	4,53	5,02
	X ₁	0,69	0,10	6,70	<0,001	0,46	0,92
	X ₂	1,30	0,10	12,60	<0,001	1,07	1,53
	X ₂ ²	-0,80	0,16	-5,31	<0,001	-1,13	-0,46
	X ₃	0,77	0,10	7,49	<0,001	0,54	1,00
	R ²	0,97					
	R ² ajustado	0,95					
	Valor <i>p</i> (modelo)	<0,001					
	Valor <i>p</i> (<i>lack of fit</i>)	0,37					
	Taninos (mg/g)	Constante	6,55	0,31	20,93	<0,001	5,85
X ₁		2,00	0,29	6,82	<0,001	1,34	2,65
X ₂		1,79	0,29	6,11	<0,001	1,14	2,44
X ₂ ²		-1,11	0,43	-2,59	0,03	-2,06	-0,15
X ₃		1,79	0,29	6,13	<0,001	1,14	2,45
R ²		0,93					
R ² ajustado		0,90					
Valor <i>p</i> (modelo)		<0,001					
Valor <i>p</i> (<i>lack of fit</i>)		0,22					
DPPH (μmol TE/g)		Constante	42,91	2,29	18,70	<0,001	37,80
	X ₁	7,87	2,15	3,67	<0,01	3,09	12,66
	X ₂	12,79	2,15	5,96	<0,001	8,00	17,57
	X ₂ ²	-7,44	3,14	-2,37	0,04	-14,44	-0,44
	X ₃	10,35	2,15	4,82	<0,001	5,57	15,13
	R ²	0,89					
	R ² ajustado	0,84					
	Valor <i>p</i> (modelo)	<0,001					
	Valor <i>p</i> (<i>lack of fit</i>)	0,17					
	ABTS (μmol TE/g)	Constante	54,63	1,97	27,71	<0,001	50,24
X ₁		8,19	1,84	4,44	<0,001	4,08	12,30
X ₂		15,72	1,84	8,52	<0,001	11,61	19,83
X ₂ ²		-6,21	2,70	-2,30	0,04	-12,23	-0,20
X ₃		10,11	1,84	5,49	<0,001	6,01	14,23
R ²		0,93					
R ² ajustado		0,90					
Valor <i>p</i> (modelo)		<0,001					
Valor <i>p</i> (<i>lack of fit</i>)		0,81					

Nota: X₁: concentração de solvente (% v/v); X₂: razão soluto/solvente (p/v); X₃: temperatura.

Figura 8 - Superfície de resposta mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes.



Nota: Números de 1 a 5: Efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de compostos fenólicos totais (1), flavonoides totais (2), taninos (3), DPPH (4) e ABTS (5); Letras de A a C: relação entre razão sólido/líquido e concentração do solvente (A), relação entre temperatura e concentração do solvente (B) e relação entre temperatura e razão sólido/líquido (C).

O procedimento de otimização foi realizado a fim de maximizar a extração do conteúdo fenólico total, flavonoides totais, taninos e atividade antioxidante por DPPH e ABTS. A otimização sugeriu a extração com etanol 60% (v/v), proporção 1:38 (p/v) a 80 °C. Em seguida, novas extrações foram realizadas em condições ideais para validação externa do modelo. Os valores observados e preditos, juntamente com os erros absolutos computados (AE) para a extração foram: fenólicos totais (mg/g) (observados: $9,75 \pm 0,37$; preditos: 10,10; AE = 3,57%), flavonoides totais (mg/g) (observado: $6,73 \pm 0,29$; previsto: 6,77; AE = 0,56%), taninos (mg/g) (observado: $12,56 \pm 0,53$; previsto: 11,06; AE = 12,00%), ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$) (observado: $84,07 \pm 4,31$; previsto: 81,92; AE = 2,62%) e DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$) (observado: $68,53 \pm 5,41$; previsto: 66,63; AE = 2,84%). Considerando os baixos erros absolutos encontrados na comparação entre os valores observados e preditos, o modelo proposto pode ser utilizado para estimar o valor da resposta no processo de extração dos compostos fenólicos de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

2.3.2 Compostos Fenólicos Individuais

Analisando a amostra do ponto otimizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, foram encontrados ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol. Esses compostos já foram encontrados em algumas outras pesquisas (MICHELON *et al.*, 2012), exceto o kaempferol. No extrato foram quantificados $158,38 \pm 1,02 \mu\text{g/g}$ de ácido gálico, $353,44 \pm 2,25 \mu\text{g/g}$ de catequina, $204,65 \pm 2,29 \mu\text{g/g}$ de epicatequina, $154,04 \pm 1,14 \mu\text{g/g}$ de quercetina e $81,68 \pm 0,37 \mu\text{g/g}$ de kaempferol. Souza *et al.* (2014), observaram teores de catequina de $140,6 \pm 2,86 \text{ mg/100g}$, epicatequina de $41,3 \pm 2,73 \text{ mg/100g}$ e quercetina de $23,2 \pm 0,06 \text{ mg/100g}$ de brácteas. Enquanto em um estudo desenvolvido por Michelon *et al.* (2012), os autores observaram para brácteas estéreis teores de catequina ($2,81 \pm 0,13 \text{ mg/g}$), epicatequina ($0,74 \pm 0,04 \text{ mg/g}$) e rutina ($0,26 \pm 0,03 \text{ mg/g}$). Os valores diferem entre si devido às condições de extração, a qual foi realizada, para ambos os trabalhos, sob refluxo a 100 °C por 15 minutos utilizando água como solvente (5%, p/v), bem como fatores intrínsecos da amostra. O ácido gálico, a catequina e a quercetina também foram encontrados nas sementes (pinhão) e a epicatequina na casca do pinheiro (BRANCO *et al.*, 2016).

Compostos fenólicos, também observados no extrato obtido de brácteas estéreis, são encontrados em diferentes matrizes vegetais e amplamente estudados devido à sua capacidade antioxidante. O ácido gálico pode ser encontrado no chá, uva, vinho, castanhas e outros produtos naturais (DAGLIA *et al.*, 2014) e sua capacidade antioxidante está relacionada com

os ácidos fenólicos. A catequina e a epicatequina pertencem à subclasse dos flavonoides, sendo frequentemente encontrados em frutas, vegetais, chá (YILMAZ, 2004). A quercetina e o kaempferol consistem em flavonóis, estando ricamente presentes no chá preto e verde (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006). Tanto os flavonóis quanto os flavonóis têm sua capacidade antioxidante associada aos flavonoides, pois apresentam alto potencial redox, portanto, alta capacidade redutora (ação antioxidante). Devido à presença desses compostos, o extrato de brácteas estéreis pode ser aplicado em produtos alimentícios como forma de melhorar as propriedades funcionais dos alimentos, uma vez que o extrato possui compostos bioativos com propriedades antioxidantes.

2.3.3 Cor do Extrato

A cor do extrato fenólico consiste em um importante parâmetro a ser analisado, uma vez que o intuito é a aplicação deste em alimentos ou outras matrizes, que dependendo da concentração adicionada de extrato, pode resultar em modificação da cor do produto. No extrato (Figura 9) foram observados valores de $59,42 \pm 0,12$; $29,43 \pm 0,09$; $74,61 \pm 0,10$; $80,21 \pm 0,12$ e $68,48 \pm 0,04$ para os parâmetros de luminosidade (L^*), coordenada vermelho/verde (a^*), coordenada amarelo/azul (b^*), Chroma (C^*) e ângulo hue (h^*), respectivamente.

Figura 9 - Extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.



Fonte: A autora.

2.4 CONCLUSÃO

Os compostos fenólicos presentes nas brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* podem ser obtidos utilizando o etanol como solvente, a partir das condições otimizadas (etanol 60% (v/v), 80 °C e razão soluto/solvente de 1:38 (p/v)). A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) demonstrou eficiência na predição dos efeitos das variáveis independentes (concentração de solvente, razão soluto/solvente e temperatura de extração) com relação a extração de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, taninos e atividade antioxidantes pelos métodos de DPPH e ABTS. Pode ser verificado, a partir do perfil fenólico observado para o extrato, que esta matriz vegetal é rica em compostos fenólicos, principalmente pertencentes à subclasse dos flavonoides, apresentando elevados níveis de atividade antioxidante, de modo a ser uma alternativa para utilização industrial das brácteas estéreis, devido suas propriedades bioativas.

**CAPÍTULO 3: ANÁLISE DO PERFIL FENÓLICO E ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE *IN VITRO*, ANTIMICROBIANA, ANTIGLICÊMICA, ANTI-
INFLAMATÓRIA, ANTIPROLIFERATIVA E CITOTOXICIDADE DE BRÁCTEAS
ESTÉREIS DE *Araucaria angustifolia***

RESUMO

A bráctea de *Araucaria angustifolia* é fonte de compostos fenólicos, como a catequina, epicatequina, apigenina e quercetina, os quais podem ser recuperados e aplicados em produtos alimentícios, objetivando o aumento do teor de compostos bioativos com propriedades funcionais. Logo, torna-se importante verificar a atividade antioxidante, antimicrobiana, antiglicêmica, anti-inflamatória e antiproliferativa, bem como a citotoxicidade do extrato. A caracterização fenólica foi realizada por meio da quantificação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, flavonóis e taninos condensados. A atividade antioxidante foi avaliada por metodologias de DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC. A atividade antimicrobiana foi avaliada quanto a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo, enquanto a atividade antiglicêmica foi realizada por meio da inibição da α -glucosidase. A análise de atividades bioativas foi realizada por meio das análises de atividades antioxidante celular, anti-inflamatória, antiproliferativa e citotoxicidade. O extrato apresentou elevados teores para as classes fenólicas e atividade antioxidante pelos métodos analisados. A atividade inibitória na concentração de 10000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 81,3%, 86,9%, 83,5% e 79,7% para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, respectivamente, enquanto para *Lactobacillus brevis* o extrato inibiu 27,9% e 19,5% nas concentrações de 15.000 e 10.000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Porém, em menores concentrações *L. brevis* demonstrou resistência, indicando que o extrato poderia ser aplicado em produtos lácteos fermentados, visando a obtenção de um produto funcional, devido sua propriedade antiglicêmica, a qual demonstrou atividade inibitória de α -glucosidase aproximadamente 10 vezes superior à acarbose, um fármaco utilizado para esta finalidade. O extrato não apresentou atividade antioxidante celular e anti-inflamatória mesmo na maior concentração investigada (400 $\mu\text{g/mL}$), mas apresentou atividade antiproliferativa contra células tumorais ($\text{GI}_{50} = 55 \pm 5$; 140 ± 7 ; 171 ± 9 $\mu\text{g/mL}$, para carcinoma de estômago, intestino e mama, respectivamente). Entretanto, o extrato apresentou toxicidade para as células não tumorais PLP2 e VERO, com GI_{50} de 41 ± 3 $\mu\text{g/mL}$ e 75 ± 7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Portanto, estudos futuros podem ser realizados para elucidar mais informações sobre a atividade tóxica do extrato para aplicação em alimentos, inclusive com outros métodos de extração e solventes.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Atividade antiglicêmica. Atividade anti-inflamatória. Atividade antiproliferativa.

3.1 INTRODUÇÃO

A bráctea de *Araucaria angustifolia* é uma matriz vegetal rica em compostos fenólicos, principalmente catequina, epicatequina, apigenina e quercetina. Estudos demonstram que compostos fenólicos apresentam elevada atividade antioxidante, antígenotóxica, antiglicêmica, anti-inflamatória e antiproliferativa (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; KHAN *et al.*, 2014;

MICHELON *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos podem auxiliar na prevenção do desenvolvimento de quadros cancerígenos por meio da capacidade antiproliferativa que estes apresentam, além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos, como a inativação de carcinógenos, parada do ciclo celular, indução da apoptose e antioxidação (REN *et al.*, 2003). Portanto, flavonoides demonstraram atividade inibitória de crescimento celular, sendo efetivo na inibição de linhagens celulares cancerosas humanas, com ausência de efeito tóxico para células saudáveis (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

Flavonoides, taninos e terpenos apresentam atividade inibitória de α -amilases. Sendo assim, alimentos ricos em compostos fenólicos, principalmente flavonoides podem ser uma alternativa para redução e controle da hiperglicemia pós-prandial (MORADI-AFRAPOLI *et al.*, 2012). De acordo com Silva *et al.* (2014), a presença de taninos em extratos de cascas de pinhão está relacionada a atividade inibitória de α -amilases salivares humanas e α -amilases pancreáticas suínas. Entretanto, as condições de extração interferem no perfil fenólico do extrato, além disso, o método e o tempo de extração são fatores que influenciam no custo do processo, portanto, se faz importante avaliar a atividade antiglicêmica em extratos obtidos com menores tempo de extração, a fim de otimizar o tempo de processo.

Além das propriedades relacionadas a benefícios à saúde, os compostos fenólicos tem sido estudados pela sua capacidade de inibir o crescimento microbiano. Compostos bioativos de matrizes vegetais possuem atividade antimicrobiana e antifúngica, sendo os compostos fenólicos relacionados a essa atividade, pois podem danificar células microbianas, modificando a propriedade de permeabilidade seletiva da membrana plasmática, resultando na perda de substâncias intracelulares (AL-HABIB *et al.*, 2010; MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010). Entre os compostos fenólicos, os compostos da subclasse dos flavonoides foram relacionados à maior atividade antimicrobiana (DAGLIA, 2012).

Dessa maneira, neste capítulo o objetivo consistiu em avaliar o extrato fenólico de brácteas estéreis com relação à sua atividade antioxidante, antimicrobiana, antiglicêmica, citotoxicidade, antioxidante celular, antiproliferativa e anti-inflamatória.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

As brácteas estéreis de pinhão (*Araucaria angustifolia*), foram coletadas na região dos Campos Gerais, no estado do Paraná em 2020. Para obtenção do extrato fenólico, foi utilizado

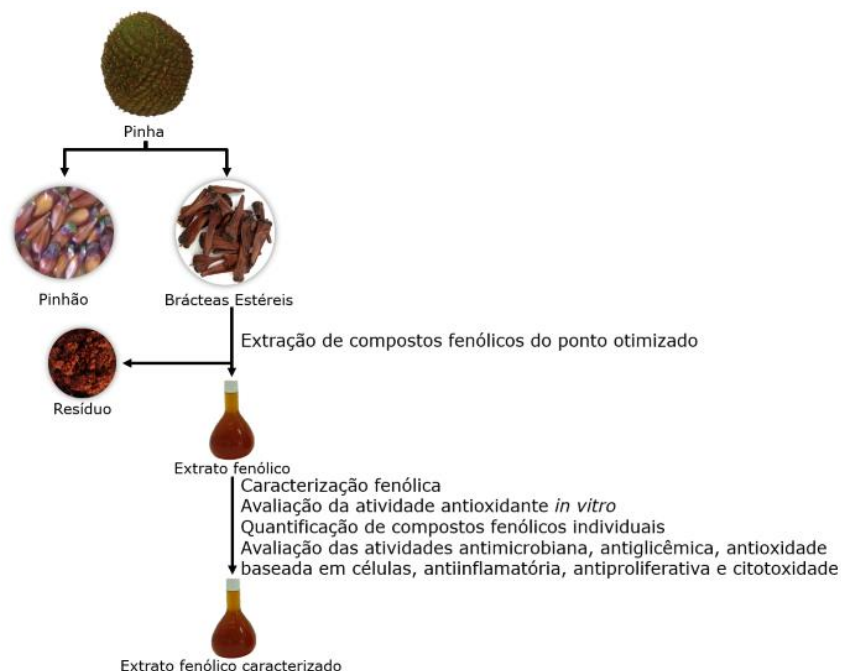
etanol (99,5%) (Biotec, PR, Brasil) na concentração de 60% para realizar a extração dos compostos de interesse.

Foram utilizados os reagentes Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil), ácido gálico, (+)- catequina e quercetina, os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O hidróxido de sódio, metanol, acetato de sódio e ácido clorídrico foram obtidos da Biotec (PR, Brasil). O nitrito de sódio e vanilina foram adquiridos da Química Moderna (SP, Brasil). O cloreto de alumínio e o persulfato de potássio da Synth (SP, Brasil) e o carbonato de sódio foi adquirido da Anidrol (SP, Brasil). Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 6538), *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076) e *Lactobacillus brevis*. O ágar nutriente e o ágar Müller Hilton foram obtidos da Kasvi (Itália), enquanto o ágar MRS foi obtido da NaveLab (PR, Brasil). As soluções aquosas foram preparadas com água destilada ou ultrapura (Milli-Q, Millipore, Brasil).

3.2.2 Métodos

O fluxograma geral dos métodos analíticos desenvolvidos para análise do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma geral dos procedimentos analíticos do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.



Fonte: A autora.

3.2.2.1 Obtenção do extrato fenólico

As brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* foram preparadas como descrito no Capítulo 2 (item 2.2.1). A extração dos compostos fenólicos foi realizada seguindo as condições otimizadas. Logo, o processo de extração foi realizado a 80 °C durante 20 minutos, utilizando 2 gramas de brácteas em uma razão de 1:38 (g amostra/mL de solvente) e etanol 60% como solvente. Em seguida, a mistura foi centrifugada (2224 x g por 15 min a temperatura ambiente; centrífuga modelo MPW-351, MPW MED. INSTRUMENTS, 600W, Varsóvia, Polônia). O sobrenadante recuperado foi rotaevaporado (evaporador rotativo modelo TE-211, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) a 50 °C para remoção do solvente.

3.2.2.2 Caracterização fenólica e atividade antioxidante

A caracterização fenólica do extrato foi realizada por meio da quantificação do teor de compostos fenólicos totais (SINGLETON; ROSSI, 1965), flavonoides totais (ZHISHEN; MENGEHENG; JIANMING, 1999), flavonóis (KUMARAN; KURUNAKARAN, 2007) e taninos condensados (BROADHURST; JONES, 1978), conforme descrito no Capítulo 2 (item 2.2.3).

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o método de eliminação do radical DPPH, proposto por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995), pelo método de captura do radical ABTS, desenvolvido por Re *et al.* (1999) — ambos descritos no Capítulo 2 (item 2.2.4) —, pelo poder antioxidante da redução do ferro pelo método de FRAP proposto por Benzie e Strain (1996) e pelo método de redução do cobre foi utilizada a metodologia de CUPRAC desenvolvida por Apak *et al.* (2008).

O poder antioxidante da redução do ferro foi determinado por meio do método de FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10 µL de amostra e 290 µL de reagente FRAP. A microplaca foi mantida ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Assim que transcorrido o tempo da reação, foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) e os dados obtidos foram comparados a uma curva de calibração de Trolox ($y = 0,001097x - 0,075339$; $R^2 = 0,992998$), onde os resultados foram expressos em µmol TE/g.

Para a determinação da atividade antioxidante através da redução do cobre foi utilizado o método desenvolvido por Apak *et al.* (2008), onde foram adicionados a tubos de ensaio um

volume de 50 µL de amostra, 500 µL de solução de cloreto de cobre (CuCl_2 $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L), 500 µL de solução de neocuproína ($7,5 \times 10^{-3}$ mol/L, em etanol 96%), 500 µL de solução tampão de acetato de amônia com pH 7,0 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) e 500 µL de água destilada. Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos ao abrigo da luz durante 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) no comprimento de onda de 450 nm e os valores obtidos foram comparados a uma curva de calibração de Trolox ($y = 0,000186x + 0,042430$; $R^2 = 0,993320$), onde os resultados foram expressos em µmol TE/g.

3.2.2.3 Atividade antimicrobiana do extrato fenólico

A atividade antimicrobiana foi avaliada quanto a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), calculada como o percentual de inibição bacteriana. As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* spp. *enterica* (ATCC 13076) e *Lactobacillus brevis*. Cada cepa foi inoculada em ágar nutriente, incubada em estufa (Estufa QUIMIS – Q-316.24, SP, Brasil) a 35 ± 1 °C por 24 horas e 48 horas para as cepas patogênicas e bactérias lácticas, respectivamente. Posteriormente, as cepas foram suspensas em solução salina de cloreto de sódio 0,9% a uma concentração de 10^8 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland's) e diluídas para obtenção da cultura de trabalho. O extrato foi seco em estufa (Marconi – MA – 035/5, SP, Brasil) até evaporação completa do solvente e posteriormente foi diluído em caldo Mueller-Hinton (10.000 a 312,5 µg/mL e 15.000 a 625 µg/mL para as cepas patogênicas e bactéria láctica, respectivamente). Em uma microplaca foram adicionados 200 µL da amostra diluída e 10 µL do microrganismo a 10^6 - 10^5 UFC/mL. Foram preparados um controle positivo e um controle negativo (clorexidina 0,1%). As microplacas foram incubadas em estufa (Estufa QUIMIS – Q-316.24, SP, Brasil) a 35 ± 1 °C por 18 a 24 horas. Após transcorrido o tempo de incubação, foram realizadas as leituras de absorbância a 600 nm em leitor de microplacas (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy – BIOTEK, Winooski, VT, USA).

3.2.2.4 Atividade antiglicêmica do extrato fenólico

A atividade antiglicêmica foi avaliada quanto a atividade inibitória da α -glicosidase, realizada de acordo com o método descrito por Moradi-Afrapoli *et al.* (2012). O extrato fenólico

foi liofilizado (Terroni, LS 3000, SP, Brasil) e posteriormente ressuspendido e diluído em DMSO 5% para obtenção das diluições seriadas (3125 a 97,65625 $\mu\text{g/mL}$). Em uma microplaca, foram pipetados 10 μL dos extratos fenólicos, 20 μL de solução enzimática de α -glicosidase (0,5 U/mL), 120 μL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,9) e então incubada (BioTek Absorbance Microplate Reader – Elx808, USA) à 37 °C durante 15 min. Posteriormente, foram adicionados 20 μL de solução de substrato (*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyronoside 5 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,9) e novamente incubada (BioTek Absorbance Microplate Reader – Elx808, USA) à 37 °C durante 15 minutos. Após transcorrido o tempo, foram adicionados 80 μL de Na_2CO_3 (0,2 M) para finalizar a reação e as leituras das absorbâncias foram realizadas a 405 nm em leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy – BIOTEK, Winooski, VT, USA). A atividade antiglicêmica do extrato foi determinada pela plotagem da % de inibição da enzima (Equação 2) *versus* a concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$), sendo expressa como IC_{50} . Um controle (sem extrato fenólico), um branco (sem a enzima α -glicosidase) e um controle de acarbose (Infinity Pharma, Campinas, SP, lote: 21A18B012074365), foram realizados.

$$\% \text{ Inibição} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100 \quad (5)$$

3.2.2.5 Atividade antioxidante celular

Para avaliar a atividade antioxidante celular foi utilizado o método descrito por Wolfe e Liu (2007). Os extratos foram dissolvidos em água para obter uma concentração de 8 mg/mL, a partir da qual foram realizadas diluições sucessivas com 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH) preparada com etanol e diluída com solução de sais balanceados de Hank (HBSS) (50 μM), obtendo as concentrações a serem testadas (500 – 2000 μM). A linhagem celular RAW 246.7 (macrófagos murinos) utilizada foi mantida em incubadora a 37°C, com atmosfera umidificada e 5% de gás carbônico e meio de cultura Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com L-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), soro fetal bovino (10%) e aminoácidos não essenciais (2 mM).

Macrófagos murinos foram separados com um raspador de células e o conteúdo foi transferido para um tubo falcon. A solução foi centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. O meio foi descartado e a quantidade de meio novo foi adicionada de acordo com o tamanho do pellet obtido. Uma solução com uma densidade celular de 70.000 células/mL foi então preparada. Uma alíquota da solução preparada (300 μL) foi transferida para microplacas com paredes pretas e fundo transparente (SPL Lifesciences) e incubadas por 48h. Após o período de

incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com HBSS (2x, 100 μ L), tratadas com diferentes concentrações de extrato (200 μ L; 32,5 - 2000 μ M) e incubadas por 1 hora. Depois, as células foram lavadas com HBSS (2x, 100 μ L) e uma solução de dicloridrato de 2,2 2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) (100 μ L; 600 μ M) foi adicionada. A fluorescência foi lida a cada 5 minutos durante 1 hora (leitor de microplacas Biotek FLx800) a 485 nm de excitação e emissão de 538 nm. A quercetina foi usada como controle positivo e diclorohidrofluoresceína e meio de cultura DMEM foram usados como controle negativo.

3.2.2.6 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através da produção de óxido nítrico (NO), induzida por LPS por macrófagos de camundongo RAW 264.7, utilizando a metodologia descrita por Corrêa *et al.* (2015). Os extratos foram dissolvidos em água para obter a concentração de 8 mg/mL, e, em seguida foram preparadas outras diluições (6,25; 25; 100 e 400 μ g/mL). A linhagem de células RAW 264.7 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e glutamina, sendo o meio mantido a 37°C sob 5% de CO₂ em ar umidificado. As células foram destacadas com um raspador de células e semeadas em microplacas de 96 poços a 150.000 células por poço e deixadas fixar à placa durante a noite. Em seguida, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do extrato por 1 hora. A Dexametasona (50 μ M) foi utilizada como controle positivo. A etapa seguinte foi a estimulação com LPS (1 μ g/mL) por 18 horas. O extrato e LPS foram dissolvidos em DMEM suplementado. Foi preparado um controle negativo sem adição de LPS utilizado com o intuito de verificar seu possível efeito sobre os níveis basais de NO. O nitrito produzido foi determinado medindo a densidade óptica a 515 nm e os resultados foram expressos como valor de IC₅₀ (μ g/mL), o qual corresponde à concentração que induz 50% de inibição da produção de NO.

3.2.2.7 Atividade antiproliferativa e hepatotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada utilizando o ensaio Sulforrodamina B (SRB) descrito por Corrêa *et al.* (2015). Foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas de carcinoma de estômago (AGS), intestino (CaCo-2), mama (MCF-7) e células não tumorais (VERO e PLP2). A hepatotoxicidade foi medida utilizando uma cultura primária de células hepáticas não tumorais de fígado suíno (PLP2). Os tecidos do fígado foram lavados em

solução salina balanceada de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e divididos em explantes de 1x1 mm³. Alguns desses explantes foram colocados em frascos para cultura de tecido de 25 cm³ em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e incubados a 37 °C com atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico. Antes da confluência, as células foram subcultivadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1,0 x 10⁴ células por poço e cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram tratadas por 48 horas com as diferentes soluções de amostra diluída. Após o período de exposição, as células foram fixadas pela adição de ácido tricloroacético frio a 50% (m/v) (TCA, 25 µL) e incubadas por 60 min a 4 °C. As placas foram então lavadas com água deionizada e secas. A solução SRB (0,1% p/vol em ácido acético a 1%, 50 µL) foi então adicionada a cada poço da placa e incubada por 30 min à temperatura ambiente. O SRB não ligado foi removido por lavagem com ácido acético a 1%. As placas foram secas ao ar e a coloração ligada foi solubilizada com 100 µL de uma solução de base Tris 100 mM. A elipticina foi utilizada como controle positivo. As densidades ópticas foram lidas em um leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como valor de GI₅₀ (µg/mL), que corresponde à concentração do extrato que inibiu 50% da proliferação celular.

3.2.2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises descritas neste trabalho foram expressos como a média seguida do desvio padrão amostral. As diferenças significativas ($p < 0,05$) dos valores médios foram avaliadas utilizando análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Fisher LSD. Todos os tratamentos estatísticos foram realizados utilizando o software STATISTICA 7.1 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização Fenólica e Atividade Antioxidante do Extrato

A caracterização fenólica do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* foi realizada a partir de uma nova extração com as condições do ponto otimizado de uma amostra

colhida na mesma região daquela utilizada na otimização da extração, porém de uma nova safra. Os resultados da caracterização fenólica e atividade antioxidante estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição fenólica e atividade antioxidante do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

	Extrato fenólico
<i>Classe fenólica (mg/kg)</i>	
Compostos fenólicos totais	22067 ± 757
Flavonoides totais	7174 ± 205
Taninos condensados	13959 ± 1127
Flavonóis	658 ± 47
<i>Atividade Antioxidante (µmol TE/kg)</i>	
DPPH	715077 ± 10443
ABTS	155369 ± 7391
FRAP	140661 ± 9901
CUPRAC	348420 ± 17139

Nota: TE: equivalentes de Trolox; DPPH: método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS: método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico; FRAP: poder antioxidante da redução do ferro; CUPRAC: atividade antioxidante redutora de íons cúpricos.

Os resultados obtidos no extrato fenólico no presente estudo são superiores aos observados por Peralta *et al.* (2016), onde os autores analisaram a composição fenólica de sementes cruas e cozidas e observaram níveis de 175 e 211 mg CTE/kg, respectivamente. Enquanto, Dorneles e Noreña (2020), observaram um teor de 47610 mg TAE/kg, sendo superior ao observado no presente trabalho. Souza *et al.* (2014), avaliaram a composição fenólica de brácteas estéreis e observaram teor médio de 15860 mg GAE/kg de brácteas, porém os autores realizaram a extração com água destilada sob refluxo a 100 °C por 15 minutos. A diferença nos teores de compostos fenólicos observados entre os trabalhos é possivelmente devido ao solvente e condições utilizados na extração dos compostos, além de fatores relacionados ao clima, práticas de cultivo, genética, fatores pré-colheita e pós-colheita e condições climáticas (OGAH *et al.*, 2014; PERSIC *et al.*, 2017). Considerando que a água não é um solvente tão eficaz para extração de compostos fenólicos e que a temperatura utilizada em alguns estudos é muito elevada, poderiam ser realizadas investigações sobre os efeitos da pressão, objetivando a otimização da extração em temperaturas reduzidas.

Para taninos condensados, Dorneles e Noreña (2020), observaram teor superior (779950 mg CATE/kg) quando comparado ao presente trabalho. O extrato fenólico apresentou teor de flavonoides totais aproximadamente 2 vezes inferior, quando comparado ao teor de 14190 mg/kg observado por Freitas *et al.* (2018), ao analisarem a casca da semente do pinhão. Comparativamente, a semente crua obteve teor de flavonoides de 580 mg CATE/kg (KOEHNLEIN *et al.*, 2012), demonstrando que a composição fenólica também é influenciada pela parte da planta, além da metodologia empregada na extração, a qual foi realizada com o método de extração assistida por micro-ondas aquoso (MAE).

Freitas *et al.* (2018), analisaram a casca da semente de pinhão e verificaram valores de atividade antioxidante de 54650 $\mu\text{mol TE/kg}$, 11780 $\mu\text{mol TE/kg}$ e 2090 $\mu\text{mol TE/kg}$ pelos métodos de ABTS, DPPH e FRAP, respectivamente, sendo estes inferiores aos observados no presente trabalho. Dorneles e Noreña (2020), avaliaram a extração de compostos bioativos de brácteas de *Araucaria angustifolia* e observaram um nível inferior de atividade antioxidante pelo método de DPPH e superior pelo método de ABTS (DPPH = 467790 $\mu\text{mol TE/kg}$; ABTS = 427280 $\mu\text{mol TE/kg}$), possivelmente devido ao método utilizado na extração, uma vez que os parâmetros utilizados influenciam o perfil fenólico e, conseqüentemente, a atividade antioxidante da amostra. Segundo os autores, a polaridade do solvente utilizado é um parâmetro a ser considerado, e quando se utiliza o método de extração assistida por micro-ondas aquoso (MAE) 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.

3.3.2 Atividade Antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana são expressos como a concentração inibitória mínima, a qual consiste na capacidade do extrato de inibir em 50% ou 90% o microrganismo em estudo. Na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ foram observadas as melhores porcentagens de inibição para *S. aureus* (81,3%), *Enterococcus* spp. (86,9%), *Salmonella* spp. (83,5%) e *E. coli* (79,7%). Já para a concentração de 5.000 $\mu\text{g/mL}$, os valores mais elevados de inibição foram observados para *Enterococcus* spp. (76,3%), *Salmonella* spp. (59,4%) e *E. coli* (57,5%). A cepa de *Enterococcus* spp. obteve as melhores porcentagens de inibição nas menores concentrações testadas, sendo 82,8%, 63,7% e 77,6% para as concentrações de 2.500 $\mu\text{g/mL}$, 1.250 $\mu\text{g/mL}$ e 625 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os melhores resultados foram observados na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$, entretanto, uma vez que essa concentração é relativamente elevada, a aplicação em alimentos pode ser difícil. Porém, menores concentrações poderiam ser aplicadas em produtos alimentícios, visando a redução da adição de conservantes sintéticos, garantindo a segurança microbiológica de alimentos, em virtude das propriedades antimicrobianas que o extrato apresenta. Além disso, têm-se observado uma crescente busca de produtos mais naturais pelos consumidores, portanto, a utilização do extrato fenólico de brácteas estéreis pode ser uma alternativa na produção de alimentos saudáveis e seguros (DEL-RÉ; JORGE, 2012; SANT'ANNA *et al.*, 2016).

Elevadas porcentagens de inibição foram verificadas para a cepa de *Enterococcus* spp., mesmo nas menores concentrações de extrato. Este gênero de bactéria apresenta grande importância na área de alimentos, uma vez que funciona como indicadora de contaminação fecal, pois são encontradas no trato intestinal de mamíferos homeotérmicos e apresentam elevada resistência (ARIAS; MURRAY, 2012).

Com relação à cepa de *Lactobacillus brevis*, nas concentrações de 15.000 µg/mL e 10.000 µg/mL, 2.500 µg/mL e 1.250 µg/mL foram observadas inibições de 27,9%, 19,5%, 7,8% e 6,3% respectivamente. Assim como relatado anteriormente, as concentrações do extrato são relativamente elevadas, entretanto, podem ser aplicadas em alimentos como uma alternativa de método de barreira, podendo ser utilizada em conjunto com outros métodos, como refrigeração, embalagem, pH e microrganismos competitivos, por exemplo, do modo a alcançar a estabilidade microbiológica e a segurança do alimento, além de minimizar os efeitos do desenvolvimento de microrganismos contaminantes nas características sensoriais e nutricionais do produto (OPAS, 2019).

3.3.3 Atividade Antiglicêmica

A atividade antiglicêmica foi avaliada quanto à atividade inibitória da α -glicosidase, onde foram observados valores de 0,58 mg/mL para o extrato fenólico. Comparando com o controle de acarbose ($IC_{50} = 5,54$ mg/mL), o qual consiste em um fármaco utilizado como inibidor da α -glicosidase, o extrato fenólico apresentou atividade inibitória aproximadamente 10 vezes superior. Portanto, o extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* se mostra como uma alternativa de agente antiglicêmico, o qual pode ser aplicado em formulações de alimentos funcionais de base láctea fermentada para a população acometida pelo Diabetes Mellitus, uma vez que foi observada baixa inibição de *Lactobacillus brevis*. Como já relatado anteriormente, existe uma busca pela descoberta de novos agentes com ação antiglicêmica, pois o fármaco utilizado apresenta uma série de efeitos colaterais, como hipoglicemia, ganho de peso, anorexia, náuseas e vômitos, gosto metálico e problemas gastrointestinais (INZUCCHI, 2007).

Schmeda-Hirschmann *et al.* (2021), observaram um elevado efeito inibitório contra α -glicosidase com valores de IC_{50} entre 0,33 a 3,15 µg/mL e 0,61 a 11,13 µg/mL para os extratos fenólicos não ligados e ligados de grãos ferveridos, respectivamente. Ainda, os extratos fenólicos provenientes da água de decocção demonstraram elevada atividade inibitória, com valores de IC_{50} variando de 0,21 a 0,94 µg/mL, sendo superiores aos valores de atividade inibitória da α -

glicosidase do extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*. De acordo com os autores, a elevada atividade inibitória pode ser decorrente do elevado conteúdo fenólico das cascas, as quais foram solubilizadas na água durante o processo de extração.

Lu *et al.* (2018), analisaram sementes de feijão-fava imaturas, realizando a extração utilizando proporção 1:20 (m/v) e metanol 80% (v/v) sob tratamento com ondas ultrassônicas por 10 min em temperatura ambiente por três vezes. Os autores verificaram atividade inibitória de α -glicosidase de extratos fenólicos de feijão-fava (*Vicia faba* L.), com valores de IC₅₀ entre 0,05 a 0,14 mg/mL para o tegumento e 0,63 a 4,74 mg/mL para os cotilédones este apresentando maior e menor atividade inibitória de α -glicosidase, respectivamente. Ainda, de acordo com os autores, ácidos fenólicos (*p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, *p*-cumárico e cafeico) e flavonoides (quercetina, catequina e epicatequina) foram observados principalmente no tegumento, demonstrando que a atividade antiglicêmica observada é possivelmente decorrente do perfil fenólico do extrato da matriz vegetal analisada.

3.3.4 Atividade Antioxidante Celular

A atividade antioxidante celular do extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* foi avaliada e não foi verificada atividade antioxidante mesmo na maior concentração testada (2000 μ g/mL). Comparativamente, o controle de quercetina apresentou inibição de $95 \pm 5\%$ na concentração de 0,3 μ g/mL. Wolfe e Liu (2007), avaliaram a atividade antioxidante celular de extratos de frutas, onde a extração foi realizada utilizando acetona 80%. Os autores verificaram maior eficiência do mirtilo (EC₅₀ = 3,44 mg/mL) na inibição da oxidação de DCFH (2',7'-diclorofluorescina) induzida pelo radical peroxil, seguido por cranberry (EC₅₀ = 11,31 mg/mL), maçã (EC₅₀ = 21,31 mg/mL), uva vermelha (EC₅₀ = 24,49 mg/mL) e uva verde (EC₅₀ = 62,89 mg/mL). Comparativamente, as cascas de Nepali Hog Plum (*Choerospondias axillaris*) apresentaram forte atividade antioxidante celular (EC₅₀ = $10,2 \pm 1,4$ e $38,9 \pm 2,1$ μ g/mL sem ou com lavagem com tampão fosfato salino, respectivamente) (LI *et al.*, 2016).

3.3.5 Atividade Anti-Inflamatória

O potencial anti-inflamatório do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* foi verificado que o extrato não exibiu atividade anti-inflamatória mesmo na maior concentração testada (400 μ g/mL), em comparação com o controle de dexametasona, que

apresentou IC₅₀ de $6,3 \pm 4 \mu\text{g/mL}$. Este resultado está de acordo com estudos de Oliveira *et al.* (2021), onde os autores não verificaram atividade anti-inflamatória nos extratos de resíduos de sementes de pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) na faixa de concentração testada (até $400 \mu\text{g/mL}$).

Extratos como os obtidos de epicarpo de jabuticaba foram relacionados com atividade anti-inflamatória para doença pulmonar obstrutiva crônica (ZHAO *et al.*, 2019) e também inibindo o crescimento de macrófagos de camundongo RAW 264.7 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020), possivelmente devido à presença do composto metil 2-[(3,4-dihidroxibenzoiloxi)-4,6-dihidroxifenil] acetato, principalmente na casca da jabuticaba. Em um estudo realizado por Dias *et al.* (2020), os autores analisaram a atividade anti-inflamatória de extratos de polpa e casca de kiwi das cultivares *Actinidia deliciosa* cv. “Hayward” (verde) e *Actinidia* spp. (vermelho) e somente observaram atividade para a casca de kiwi da variedade verde, com valor de IC₅₀ de $316 \pm 6 \mu\text{g/mL}$.

3.3.6 Atividade Antiproliferativa e Hepatotoxicidade

O câncer está entre as doenças que mais resultam em morte no mundo, além da dificuldade do tratamento, o qual é debilitante e reduz a qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela enfermidade. Alimentos e fitoquímicos ricos em compostos fenólicos têm se apresentado como uma alternativa no auxílio da prevenção do desenvolvimento de células anormais. O extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* foi avaliado quanto sua atividade inibitória no crescimento de três linhagens de células tumorais (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade antiproliferativa e de citotoxicidade do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*.

Atividade antiproliferativa GI₅₀ (μg/mL)	Extrato fenólico	Elipticina
AGS (carcinoma de estômago)	55 ± 5	$1,23 \pm 0,03$
CaCo-2 (carcinoma de intestino)	140 ± 7	$1,21 \pm 0,02$
MCF-7 (carcinoma de mama)	171 ± 9	$1,02 \pm 0,02$
PLP2 (célula não tumoral)	41 ± 3	$1,4 \pm 0,1$
VERO (célula não tumoral)	75 ± 7	$1,41 \pm 0,06$

O extrato foi capaz de inibir o desenvolvimento de células tumorais, com valores de GI₅₀ variando de 55 a $171 \mu\text{g/mL}$ para o carcinoma de estômago e mama, respectivamente, sendo este valor superior ao observado para o controle de elipticina, o que reflete que o controle apresenta um maior potencial antiproliferativo. Entretanto, o extrato de brácteas estéreis apresentou atividade superior ao observado por Albuquerque *et al.* (2020), onde os autores avaliaram a atividade antiproliferativa de extrato de epicarpo de jabuticaba sobre o crescimento

de células tumorais de carcinoma de mama e observaram valor de GI₅₀ de 300 µg/mL, sendo, portanto, necessária uma concentração aproximadamente duas vezes superior para inibir 50% da proliferação celular.

Todavia, o extrato de brácteas estéreis apresentou atividade citotóxica para as células não tumorais analisadas (PLP2 e VERO) em menores valores de GI₅₀, ou seja, uma menor concentração é necessária para expressar inibição da proliferação celular em células não tumorais, demonstrando, dessa forma, a toxicidade do extrato de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* para células normais.

Oliveira *et al.* (2021), avaliaram as propriedades bioativas de extratos de resíduos de sementes de pinhão obtidos por meio do cozimento em água e extrato etanólico das cascas e observaram que o extrato aquoso não apresentou capacidade de inibição de nenhuma das células cancerígenas investigadas. Entretanto, o extrato etanólico apresentou atividade citotóxica para todas as linhagens tumorais, sendo mais eficaz contra o carcinoma hepatocelular. Além disso, mesmo na maior concentração avaliada (400 µg/mL) ambos os extratos não apresentaram efeito citotóxico em células hepáticas suínas normais (sem carcinoma), indicando que o extrato não afeta células não tumorais. Esta diferença de toxicidade com o presente trabalho pode estar relacionada ao conteúdo fenólico, possivelmente devido ao método de extração empregado, bem como fatores intrínsecos da amostra.

As plantas apresentam compostos bioativos em sua composição e, por consequência podem apresentar potencial tóxico devido seus constituintes químicos. Portanto, algumas plantas utilizadas como alimento e/ou na medicina tradicional têm sido relacionadas com efeitos tóxicos, como atividade mutagênica e cancerígena. O melão de São Caetano (*Momordica charantia*) apresenta propriedades antidiabéticas e antimalárica, mas em contrapartida pode causar hipoglicemia mortal em crianças (KOMLAGA *et al.*, 2015; RAMAN; LAU, 1996; VAN ANDEL; MYREN; ONSELEN, 2012). Da mesma forma, *Lantana camara*, conhecida popularmente como camará, é utilizada no manejo da malária, entretanto, esta cultura foi relacionada com atividade de hepatotoxicidade em animais (ruminantes, coelhos e ratos), logo, a utilização crônica da *Lantana camara* é motivo de preocupação (SHARMA *et al.*, 2007).

Ala, Olotu e Ohia (2013), avaliaram a citotoxicidade de extratos de folhas de *Andrographis paniculata* e *Aspilia africana* em células murinas *in vitro* para verificar a segurança de tratamento combinado das duas plantas, uma vez que o uso isolado de cada planta é considerado seguro, logo, os autores investigaram o possível efeito sinérgico. Os autores observaram um efeito citotóxico da combinação de extratos das duas plantas combinadas em uma relação 1:1, por uma redução da viabilidade celular de esplenócitos (89% para 35%),

timócitos (67% para 28%) e hepatócitos (69% para 64%) e que esta redução da viabilidade das células é dependente do aumento da concentração (4 µg/mL – 500 µg/mL). Ou seja, a incubação dos extratos combinados por 72 h foi tóxica para as células e o nível do dano celular é dependente da concentração.

Como expresso por Paracelsus, “Todas as substâncias são venenos; não há nenhum, que não seja veneno. A dose certa diferencia um veneno e um remédio”, ou seja, uma substância que não apresenta toxicidade pode ser tóxica em doses elevadas, bem como uma substância com elevada toxicidade pode ser considerada segura quando administrada em baixas doses (DESHPANDE, 2002; HILL, 1997). Logo, administrar a dose correta de plantas medicinais e alimentos é imprescindível para fornecer os benefícios que os compostos bioativos podem apresentar, sem qualquer reação adversa ou efeito prejudicial às células (MENSAH *et al.*, 2019).

Mais estudos devem ser realizados visando elucidar informações sobre a biodisponibilidade e bioatividade de alimentos adicionados de extrato fenólico de brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*, e dessa forma, obter mais informações sobre a toxicidade do extrato em células normais.

3.4 CONCLUSÃO

O conteúdo fenólico e atividade antioxidante encontrado no extrato fenólico obtido das brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* apresentaram teores elevados, sendo, em muitos casos, superiores aos presentes na literatura. O extrato apresentou boa atividade antimicrobiana para as bactérias patogênicas e lática analisadas, demonstrando sua capacidade em inibir as cepas dos microrganismos testados nas concentrações de estudo. Entretanto, nas concentrações mais baixas investigadas as bactérias láticas demonstraram maior resistência, o que sugere que o extrato poderia ser aplicado em alimentos funcionais. Uma das alternativas poderia ser um produto de base láctea fermentada, visando suprir um nicho de mercado para a população que busca alimentos que causem menor hiperglicemia pós-prandial, uma vez que o extrato demonstrou elevada inibição da enzima α -glicosidase na análise da atividade antiglicêmica. Entretanto, esta aplicação deve ser avaliada quanto as atividades de citotoxicidade de células normais (não tumorais), bem como ensaios de bioatividade e biodisponibilidade, uma vez que o extrato demonstrou toxicidade em células PLP2 e VERO, avaliando uma concentração segura para consumo. Além disso, o extrato não apresentou atividade antioxidante celular e anti-inflamatória, o que está de acordo com a literatura para esta matriz vegetal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coleta das brácteas em sistemas de plantio comercial da *Araucaria angustifolia*, como madeira de reflorestamento, além do pinhão, poderia ser mais uma fonte de renda, motivando o seu plantio. Além disso, a industrialização do pinhão geraria como resíduo a sua casca, a qual poderia ser explorada da mesma maneira das brácteas estéreis, o que poderia ser investigado em trabalhos futuros.

A otimização utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta permitiu a definição das condições ideais de extração, maximizando o conteúdo fenólico e atividade antioxidante das brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia*. Os compostos identificados no extrato pertencem principalmente à subclasse dos flavonoides, os quais apresentam elevada atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas. Apesar das bactérias lácticas apresentarem certa resistência a grande parte dos antimicrobianos, o extrato foi capaz de inibir a cepa de *Lactobacillus brevis* de forma razoável, logo, o extrato pode ser uma alternativa para aplicação em alimentos.

Os flavonoides têm sido relacionados com propriedades funcionais, atuando como um auxiliar na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, problemas cognitivos, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares e degenerativas. Logo, avaliar as propriedades funcionais do extrato é de suma importância e atualmente estão sendo avaliadas por meio de análises de atividade antiglicêmica, antioxidante celular, anti-inflamatória e antiproliferativa. Entretanto, o consumo excessivo de compostos fenólicos pode resultar em um efeito contrário, ou seja, pode ser desencadeado um comportamento pró-oxidante, portanto, a dose ideal e segura do extrato deve ser determinada, para que este apresente ação inibitória somente contra as células tumorais, sem qualquer efeito nocivo às células normais, o que pode ser avaliado pela análise de atividade de citotoxicidade. Nas análises de bioatividade, o extrato demonstrou elevada inibição da enzima α -glicosidase na análise da atividade antiglicêmica, o que sugere que o extrato de brácteas de *Araucaria angustifolia* pode ser estudado como uma alternativa de agente antiglicêmico, visando a redução da glicemia pós-prandial. O extrato apresentou efeito inibitório de proliferação celular contra células de carcinoma de estômago, intestino e mama, entretanto, também apresentou efeito tóxico para células não tumorais. Portanto, mais estudos podem ser realizados para avaliar os possíveis efeitos da adição do extrato em alimentos, elucidando, dessa forma, a dose ideal e segura para incorporação em alimentos, o que deve ser profundamente avaliado com ensaios de bioatividade e biodisponibilidade *in vivo*.

Desta maneira, este trabalho apresenta informações relevantes que podem contribuir no aproveitamento das brácteas estéreis de *Araucaria angustifolia* como matéria-prima para utilização de compostos fenólicos, antioxidantes, antibacterianos, antiglicêmicos e antiproliferativa, contribuindo para a pesquisa de compostos naturais com finalidade de aplicação em produtos alimentícios. Porém, mais estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos *in vivo* do extrato fenólico, principalmente relacionados aos efeitos citotóxicos em células não tumorais. Além disso, poderiam ser investigados outros métodos de extração, bem como outros solventes considerados seguros, como a água, mesmo esta apresentando menor rendimento de extração.

REFERÊNCIAS

- ABUGA, I.; SULAIMAN, S. F.; WAHAB, R. A.; OOI, K. L.; RASAD, M. S. B. A. In vitro antibacterial effect of the leaf extract of *Murraya koenigii* on cell membrane destruction against pathogenic bacteria and phenolic compounds identification. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 33, 101010, jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1876382019309758>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.101010>
- ALA, A. A.; OLOTU, B. B.; OHIA, C. M. D. Assessment of cytotoxicity of leaf extracts of *Andrographis paniculata* and *Aspilia africana* on murine cells *in vitro*. **Archives of basic and applied medicine**, v. 6, n. 1, p. 61-65, fev. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6141048/>. Acesso em: 20 fev. 2022. PMID: 30234147; PMCID: PMC6141048.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, abr. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613015343>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.086>
- ALBUQUERQUE, B. R.; PEREIRA, C.; CALHELHA, R. C.; ALVES, M. J.; ABREU, R. M. V.; BARROS, L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Jabuticaba residues (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 309, 125735, mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619318643>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125735>
- ALEKSANDROVA, K.; PISCHON, T.; JENAB, M. *et al.* Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. **BMC Medicine**, v. 12, 168, out. 2014. Disponível em: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0168-4>. Acesso em: 01 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0168-4>
- AL-HABIB, A.; AL-SALEH, E.; SAFER, A.; AFZAL, M. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 3, p. 357-364, jun. 2010. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/35/3/35_3_357/_article. Acesso em: 11 mar. 2020. <https://doi.org/10.2131/jts.35.357>
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/XS9CsdV86YbjrxfMjLGmXVL/?lang=pt>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- AMIN, M. U.; KHURRAM, M.; KHATTAK, B.; KHAN, J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 15, n. 59, p. 59-70, mar. 2015.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879586/>. Acesso em: 24 fev. 2021.
<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0580-0>

ANDEL, T. V.; MYREN, B.; ONSELEN, S. V. Ghana's herbal market. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 368-378, mar. 2012. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306470/>. Acesso em: 19 fev. 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.028>

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p.1-9, jan.-abr. 2007. Disponível em:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-497792>. Acesso em: 25 mai. 2020.

APAK, R.; GUCLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 413-419, mai. 2008. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-007-0777-0>. Acesso em: 15 abr. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s00604-007-0777-0>

APREMAVI - Associação de Preservação do Meio Ambiente e da Vida. *Araucaria angustifolia*: uma análise da espécie sob o viés da história ambiental global. Disponível em:
[https://apremavi.org.br/araucaria-angustifolia-uma-analise-da-especie-sob-o-vies-da-historia-ambiental-global/#:~:text=Os%20registros%20f%C3%B3sseis%20indicam%20que,Araucaria%20angustifolia\)%20urgiu%20neste%20per%C3%ADodo..](https://apremavi.org.br/araucaria-angustifolia-uma-analise-da-especie-sob-o-vies-da-historia-ambiental-global/#:~:text=Os%20registros%20f%C3%B3sseis%20indicam%20que,Araucaria%20angustifolia)%20urgiu%20neste%20per%C3%ADodo..) Acesso em: 20 fev. 2022.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p. 266–278, mar. 2012. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/nrmicro2761>. Acesso em: 04 dez. 2021.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>

ASAHI, Y.; NOIRI, Y.; MIURA, J.; MAEZONO, H.; YAMAGUCHI, M.; YAMAMOTO, R.; AZAKAMI, H.; HAYASHI, M.; EBISU, S. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 5, p. 1164-1171, mai. 2014. Disponível em:
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12458>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.12458>

BANERJEE, K.; BANERJEE, S.; DAS, S.; MANDAL, M. Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 453, p. 48-59, set. 2015. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021979715004002>. Acesso em: 25 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.030>

BENINCA, C.; BISINELLA, R. Z. B.; BET, C. D.; DE OLIVEIRA, C. S.; BARBOZA, R. A.; COLMAN, T. A. D.; DEMIATE, I. V.; SCHNITZLER, E. Effect of aqueous and ethanolic extracts from *pinhão* coats on the properties of corn and *pinhão* starches. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 140, p. 743-753, out. 2019. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10973-019-08811-7>. Acesso em: 05 dez. 2021.
<https://doi.org/10.1007/s10973-019-08811-7>

BENVENUTTI, L.; BORTOLINI, D. G.; NOGUEIRA, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A. Effect of addition of phenolic compounds recovered from apple pomace on cider quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 348–354, fev. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818309332?via%3Dihub>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.087>

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, jul. 1996. Disponível em: <https://www.meta.org/papers/the-ferric-reducing-ability-of-plasma-frap-as-a/8660627>. Acesso em: 15 abr. 2020. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BERUBE, B. J.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1140-1166, jun. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717774/>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>

BIHAREE, A.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; JAITAK, V. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. **Fitoterapia**, v. 146, 104720, out. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X20303026>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720>

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 157-177, mai.- jun. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725801001371?via%3Dihub>. Acesso em: 01 dez. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00137-1)

BORDELEAU, E.; MAZINANI, S. A.; NGUYEN, D.; BETANCOURT, F.; YAN, H. Abrasive treatment of microtiter plates improves the reproducibility of bacterial biofilm assays. **RSC Advances**, v. 8, n. 57, p. 32434-32439, set. 2018. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/RA/2018/C8RA06352D#!divAbstract>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1039/C8RA06352D>

BORGES, A.; SERRA, S.; ABREU, A. C.; SAAVEDRA, M. J.; SALGADO, A.; SIMÕES, M. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and *in vitro* cytotoxicity. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 30, n. 2, p. 183-195, dez. 2013. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2013.852542>. Acesso em: 31 mar. 2021. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.852542>

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, nov. 1960. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/1266454?seq=1>. Acesso em: 26 jul. 2020. <https://doi.org/10.2307/1266454>

BRANCO, C. S.; RODRIGUES, T. S.; LIMA, É. D.; CALLONI, C.; SCOLA, G.; SALVADOR, M. Chemical constituents and biological activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **Journal of Organic & Inorganic Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1-10, fev. 2016. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/300080044_Chemical_Constituents_and_Biological_Activities_of_Araucaria_angustifolia_Bertol_O_Kuntze_A_Review. Acesso em: 17 fev. 2021. <https://doi.org/10.21767/2472-1123.100008>

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 15 abr. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, 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, nov. 2018. Disponível em:

<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>. Acesso em: 01 dez. 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BREIMER, L. H. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. **Molecular Carcinogenesis**, v. 3, n. 4, p. 188-197, set. 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2206282/>. Acesso em: 05 dez. 2021.

<https://doi.org/10.1002/mc.2940030405>

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, n. 9, p. 788–794, set. 1978. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740290908>. Acesso em: 30 mar. 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290908>

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical design – Chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006, p. 273.

CALVETE, T.; LIMA, E. C.; CARDOSO, N. F.; DIAS, S. L. P.; PAVAN, F. A. Application of carbon adsorbents prepared from the Brazilian pine-fruit-shell for the removal of Procion Red MX 3B from aqueous solution—Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies.

Chemical Engineering Journal, v. 155, p. 627-636, dez. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894709005907>. Acesso em: 27 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.08.019>

CALVETE, T.; LIMA, E. C.; CARDOSO, N. F.; VAGHETTI, J. C. P.; DIAS, S. L. P.; PAVAN, F. A. Application of carbon adsorbents prepared from Brazilian-pine fruit shell for the removal of reactive orange 16 from aqueous solution: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 8, p. 1695-1706, ago. 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147971000085X>. Acesso em: 27 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.03.013>

CÂMARA, B. **As 5 fases da inflamação e os 5 sinais cardinais**. Biomedicina Padrão.

Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/05/as-5-fases-da-inflamacao-e-os-5-sinais.html>. Acesso em: 01 dez. 2021.

CARVALHO, P. E. R. Pinheiro-do-paraná. **Circular Técnica Embrapa**, v. 60, p. 1–17, nov. 2002. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/304455>. Acesso em: 05 dez. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laborator Standards Institute, 2012.

CORDENUNSI, B. R.; MENEZES, E. W., GENOVESE, M. I., COLLI, C., SOUZA, A. G., LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3412-3416, jun. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15161207/>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1021/jf034814l>

CORRÊA, R. C. G.; SOUZA, A. H. P.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; GLAMOCLIJ, J.; SOKOVIC, M.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. **Food & Function**, v. 6, p. 2155-2164, jun. 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/fo/c5fo00465a/unauth#cit32>. Acesso em: 17 fev. 2022. <https://doi.org/10.1039/C5FO00465A>

COSTA JÚNIOR, S. D.; SANTOS, J. V. O.; CAMPOS, L. A. A.; PEREIRA, M. A.; MAGALHÃES, N. S. S.; CAVALCANTI, I. M. F. Antibacterial and antibiofilm activities of quercetin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* with resistance profile. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 1948-1958, set.-out. 2018. Disponível em: <https://ijeab.com/detail/antibacterial-and-antibiofilm-activities-of-quercetin-against-clinical-isolates-of-staphylococcus-aureus-and-staphylococcus-saprophyticus-with-resistance-profile/>. Acesso em: 29 mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/3.5.50>

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n. 3, p. 241-256, jul. 2009. Disponível em: <https://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/51>. Acesso em: 05 dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20090024>

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, abr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925860/>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>

DAGLIA, M.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; TALAS, Z. S.; NABAVI, S. M. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat!. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 362-372, abr. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24938889/>. Acesso em: 01 dez. 2021. <https://doi.org/10.2174/138920101504140825120737>

DEL-RE, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, abr. 2012. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/pDztw6sV5YYJCDSKPJJjFTP/?lang=pt>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200021>

DESHPANDE, S. S. **Handbook of Food Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 2002, p. 1-5.

DIAS, M.; CALEJA, C.; PEREIRA, C. CALHELHA, R. C.; KOSTIC, M.; SOKOVIC, M.; TAVARES, D.; BARALDI, I. J.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive properties of byproducts from two different kiwi varieties. **Food Research International**, v. 127, 108753, jan. 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919306398?via%3Dihub>. Acesso em: 17 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108753>

DONG, J. QIU, J.; WANG, J.; LI, H.; DAI, X.; ZHANG, Y.; WANG, X.; TAN, W.; NIU, X.; DENG, X.; ZHAO, S. Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 338, n. 2, p. 124-131, out. 2012. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1574-6968.12040>. Acesso em: 31 mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12040>

DORNELES, M. S.; NOREÑA, C. P. Z. Extraction of bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* bracts by microwave-assisted extraction. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 6, e14481, abr. 2020. Disponível em:

<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.14481>. Acesso em: 26 out. 2020. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14481>

DURLING, N. E.; CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; WEBBY, R. F.; MITCHELL, K. A.; FOO, L. Y.; PERRY, N. B. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1417–1424, dez. 2007. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606002913>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.050>

EMBRAPA. **Comunicado Técnico - Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007.

EMBRAPA. **Comunicado Técnico - Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007.

FARRIS, S.; PIERGIOVANNI, L. Optimization of manufacture of almond paste cookies using response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 32, n. 1, p. 64-87, jan. 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-4530.2007.00203.x>. Acesso em: 06 dez. 2021. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00203.x>

FATHIMA, A.; RAO, J. R. Selective toxicity of Catechin – a natural flavonoid towards bactéria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6395-6402, abr. 2016.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7492-x>. Acesso em: 25 mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7492-x>

FREITAS, A. M.; ALMEIDA, M. T. R.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; CARDOZO, F. T. G. S.; BARARDI, C. R. M.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 512-517, dez. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874109005637>. Acesso em: 23 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.005>

FREITAS, T. B.; SANTOS, C. H. K.; SILVA, M. V.; SHIRAI, M. A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; 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, mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214289417300868>. Acesso em: 26 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.10.006>

GCO. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 01 dez. 2021.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2023–2044, jul. 2012. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>. Acesso em: 07 mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>

HERTEL, W.; PESCHEL, G.; OZEGOWSKI, J. H.; MÜLLER, P. J. Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes. **Archiv der Pharmazie**, v. 339, n. 6, p. 313-318, mai. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16718670/>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1002/ardp.200500216>

HILL, M. S. **Understanding Environmental Pollution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997, p. 316.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Extração vegetal e Silvicultura**. 2019. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/16/0?tipo=grafico&indicador=12728&localidade1=0&localidade2=41>. Acesso em: 16 fev. 2022.

Instituto Nacional de Câncer. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 01 dez. 2021.

INZUCCHI, S. E. **Diabete Melito: Manual de Cuidados Essenciais**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JORGE, T.; DE DEA LINDNER, J.; MEJIA, S. M. V.; MATTIONI, B.; ROTTA, J.; MORÉS, S.; FRANCISCO, A.; SANT'ANNA, E. S. Physicochemical study of pinhão flour as source of adjunct in beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p.

365-373, ago. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.507>. Acesso em: 13 abr. 2020. <https://doi.org/10.1002/jib.507>

JURADO, J.; ALEJANDRE-DURÁN, E.; ALONSO-MORAGA, A.; PUEYO, C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. **Mutagenesis**, v. 6, n. 4, p. 289-295, jul. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1943719/>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1093/mutage/6.4.289>

KANG, S. S.; KIM, J. -G.; LEE, T. -H.; OH, K. -B. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 1751-1755, ago. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880637/>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1751>

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 249-258, fev. 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1383>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1383>

KHAN, N.; KHYMENETS, O.; URPÍ-SARDÀ, M.; TULIPANI, S.; GARCIA-ALOY, M.; MONAGAS, M.; MORA-CUBILLOS, X.; LLORACH, R.; ANDRES-LACUEVA, C. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 844-880, fev. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24566441/>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/nu6020844>

KOEHNLEIN, E. A.; CARVAJAL, A. E. S.; KOEHNLEIN, E. M.; COELHO-MOREIRA, J. S.; INÁCIO, F. D.; CASTOLDI, R.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. 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, nov. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273716142_Antioxidant_activities_and_phenolic_compounds_of_raw_and_cooked_Brazilian_pinhao_Araucaria_angustifolia_seeds. Acesso em: 17 fev. 2021. <https://doi.org/10.5897/AJFS12.128>

KOMLAGA, G.; AGYARE, C.; DICKSON, R. A.; MENSAH, M. L. K.; ANNAN, K.; LOISEAU, P. M.; CHAMPY, P. Medicinal plants and finished marketed herbal products used in the treatment of malaria in the Ashanti region, Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 333-346, jul. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151245/>. Acesso em: 19 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.041>

KOO, H.; HAYACIBARA, M. F.; SCHOBEL, B. D.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K.; VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782-789, nov. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14563892/>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg449>

KOTECHA, R.; TAKAMI, A.; ESPINOZA, J. L. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52517-52529, mai. 2016. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/9593/text/>. Acesso em: 01 dez. 2021. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9593>

- KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 344-352, mar. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643805002227>. Acesso em: 15 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011>
- LEE, J-H.; PARK, J-H.; CHO, M. H.; LEE, J. Flavone reduces the production of virulence factors, staphyloxanthin and α -hemolysin, in *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 726-732, set. 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-012-0229-x>. Acesso em: 31 mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0229-x>
- LEWIS, M. **Beer and Brewing**. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, p. 1-30, 2015.
- LI, B. H.; TIAN, W. X. Inhibitory effects of flavonoids on animal fatty acid synthase. **The Journal of Biochemistry**, v. 135, n. 1, p. 85-91, jan. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14999013/>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh010>
- LI, Q.; WANG, X.; DAI, T.; LIU, C.; LI, T.; MCCLEMENTS, D. J.; CHEN, J.; LIU, J. Proanthocyanidins, isolated from *Choerospondias axillaris* fruit peels, exhibit potent antioxidant activities *in vitro* and a novel anti-angiogenic property *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3546-3556, abr. 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b00236>. Acesso em: 20 fev. 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00236>
- LIMA, E. C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J. C. P.; BRASIL, J. L.; SIMON, N. M.; SANTOS JR., A. A.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; BENVENUTTI, E. V.; SILVA, E. A. Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, n. 1-2, p. 211-220, fev. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389406007254>. Acesso em: 27 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.073>
- LIMA, E. C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J. C.; SIMON, N. M.; CUNHA, B. M.; PAVAN, F. A.; BENVENUTTI, E. V.; VESES, R. C.; AIROLDI, C. Application of Brazilian pine-fruit shell as a biosorbent to removal of reactive red 194 textile dye from aqueous solution: Kinetics and equilibrium study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, n. 3, p. 536-550, jul. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18178307/>. Acesso em: 27 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.101>
- LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47-56, nov. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814604006910>. Acesso em: 19 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>
- LU, Y.-H.; TIAN, C.-R.; GAO, C.-Y.; WANG, B.-N.; YANG, W.-Y.; KONG, X.; CHAI, L.-Q.; CHEN, G.-C.; YIN, X.-F.; HE, Y.-H. Phenolic composition, antioxidant capacity and

inhibitory effects on α -glucosidase and lipase of immature faba bean seeds. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 2366-2377, set. 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2018.1522331>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1522331>

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R.L.C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais. Botucatu**, v. 12, n. 3, p. 380-397, jan. 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722010000300016&script=sci_abstract. Acesso em: 13 ago. 2020.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 401-407, jun. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/jL3vtqzbtswD7xkxdMKVMMQ/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 01 dez. 2021. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200024>

MCCUE, P.; KWON, Y-I.; SHETTY, K. Anti-Amylase, Anti-Glucosidase and Anti-Angiotensin I-Converting Enzyme Potential of Selected Foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 278-294, jun. 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4514.2005.00020.x>. Acesso em: 15 nov. 2021. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00020.x>

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L. S. D.; FÉLIX, G. L. Q.; SOMENSI, A.; TOMAZZOLI, M.; SILVA, D. A.; BERTI, F. V.; VELEIRINHO, M. B. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; ZERI, A. C. M.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an *in vitro* and *in vivo* study. **Microvascular Research**, v. 88, p. 1-11, jul. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026286213000320?via%3Dihub>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.03.003>

MENSAH, M. L. K.; KOMLAGA, G.; FORKUNO, A. D.; FIREMPONG, C.; ANNING, A. K.; DICKSON, R. A. **Herbal Medicine - Toxicity and Safety Implications of Herbal Medicines Used in Africa**. Londres: IntechOpen, 2019, p. 63-86.

MICHELON, F.; BRANCO, C. S.; CALLONI, C.; GIAZZON, I.; AGOSTINI, F.; SPADA, P. K. W.; SALVADOR, M. *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Current Nutrition & Food Science**, v. 8, p. 155-159, ago. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236857802_Araucaria_Angustifolia_A_Potential_Nutraceutical_with_Antioxidant_and_Antimutagenic_Activities. Acesso em: 26 out. 2020. <https://doi.org/10.2174/157340112802651103>

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, set. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944501397800341>. Acesso em: 24 fev. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80034-1)

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, set.-out. 2005. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000500029. Acesso em: 13 ago. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>

MORADI-AFRAPOLI, F.; ASGHARI, B.; SAEIDNIA, S.; AJANI, Y.; MIRJANI, M.; MALMIR, M.; BAZAZ, R. D.; HADJIAKHOONDI, A.; SALEHI, P.; HAMBURGER, M.; YASSA, N. *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, 37, set. 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186%2F2008-2231-20-37>. Acesso em: 15 nov. 2021. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-37>

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, dez. 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01320>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1038/nature01320>

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, n. 1-2, p. 208–215, fev. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267009015931?via%3Dihub>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.058>

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, set. 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501574q>. Acesso em: 06 dez. 2021. <https://doi.org/10.1021/jf501574q>

OHEMENG, K.; SCHWENDER, C.; FU, K.; BARRETT, J. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 225-230, fev. 1993. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X01808817>. Acesso em: 24 fev. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80881-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80881-7)

OLIVEIRA, A.; MOREIRA, T. F. M.; PEPINELLI, A. L. S.; COSTA, L. G. M. A.; LEAL, L. E.; SILVA, T. B. V.; GONÇALVES, O. H.; INEU, R. P.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; ABREU, R. M. V.; FERREIRA, I. C. F. R.; BRACHT, L.; LEIMANN, F. V. Bioactivity screening of pinhão (*Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze) seed extracts: the inhibition of cholinesterases and α -amylases, and cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Food & Function**, v. 20, p. 1-28, 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D1FO01163D>. Acesso em: 29 nov. 2021. <https://doi.org/10.1039/D1FO01163D>

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Tecnologias de conservação aplicadas à segurança de alimentos**. Washington: OPAS, 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51502>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.37774/9789275721032>

OUYANG, J.; SUN, F.; FENG, W.; SUN, Y.; QIU, X.; XIONG, L.; LIU, Y.; CHEN, Y. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors

in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 966-974, jan. 2016. Disponível em:

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13073>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.13073>

ÖZYÜREK, M.; GÜCLÜ, K. TÜTEM, E.; BASKAN, K. S.; ERCAG, E.; ÇELİK, S.E.; BAKI, S.; YILDIZ, L.; KARAMAN, S.; APAK, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. **Journal the Royal Society of Chemistry – Analytical Methods**, v. 3, p. 2439-2453, out. 2011. Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/ay/c1ay05320e#!divAbstract>. Acesso em: 25 jun. 2020. <https://doi.org/10.1039/C1AY05320E>

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 & Technology**, v. 54, p. 85-93, ago. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416301650>. Acesso em: 04 mai. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.013>

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. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 23–31, set. 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817302360?via%3Dihub>. Acesso em: 06 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.017>

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑES, M. J. Effect of solvents, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111–2117, fev. 2005. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0488110>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1021/jf0488110>

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

POPP, R.; SCHIMMER, O. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. **Mutation Research**, v. 246, n. 1, p. 205-213, jan. 1991. Disponível:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1986264/>. Acesso em: 05 dez. 2021. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90123-6)

PLAPER, A.; GOLOB, M.; HAFNER, I.; OBLAK, M.; ŠOLMAJER, T.; JERALA, R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, n. 2, p. 530-536, jun. 2003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X03010064?via%3Dihub>. Acesso em: 24 fev. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01006-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01006-4)

POPP, R.; SCHIMMER, O. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. **Mutation Research**, v. 246, n. 1, p. 205-213, jan. 1991. Disponível:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1986264/>. Acesso em: 05 dez. 2021.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90123-6)

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 349-362, mar. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23194773/#:~:text=Unripe%20fruit%2C%20seeds%20and%20aerial,diabetic%20animals%20and%20in%20humans..> Acesso em: 19 fev. 2022.
[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80080-8)

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, mai. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584998003153>. Acesso em: 15 abr. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

REECE, R. J.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, p. 335-375, set. 1991. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10409239109114072>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.3109/10409239109114072>

REGINATO, F. Z.; SILVA, A. R. H.; BAUERMANN, L. F. Avaliação do uso de flavonoides no tratamento da inflamação. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 49, n. 3, p. 569-582, jul.-set. 2015. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000300016. Acesso em: 01 dez. 2021.

REN, W.; QIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 3, p. 519-534, abr. 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.10033>. Acesso em: 01 dez. 2021.
<https://doi.org/10.1002/med.10033>

ROYER, B.; CARDOSO, N. F.; LIMA, E. C.; VAGHETTI, J. C. P.; SIMON, N. M.; CALVETE, T.; VESES, R. C. Applications of Brazilian pine-fruit shell in natural and carbonized forms as absorbents to removal of methylene blue from aqueous solutions – Kinetic and equilibrium study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2-3, p. 1213-1222, mai. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389408013666>. Acesso em: 27 abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.028>

SANT'ANNA, V.; SFOGLIA, N. M.; MERCALI, G. D.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Effect of cooking on polyphenols and antioxidant activity of *Araucaria angustifolia* seed coat and evaluation of phytochemical and microbiological stability over storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 8, p. 1932-1936, jul. 2016. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.13170>. Acesso em: 13 abr. 2020. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13170>

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ANTILEO-LAURIE, J.; THEODULOZ, C.; JIMÉNEZ-ASPEE, F.; AVILA, F.; BURGOS-EDWARDS, A.; OLATE-OLAVE, V. Phenolic composition, antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity of raw and boiled Chilean *Araucaria araucana* kernels. **Food Chemistry**, v. 350, 129241, jul. 2021. Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814621002454?via%3Dihub>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129241>

SECCON, A.; ROSA, D. W.; FREITAS, R. A.; BIAVATTI, M. W.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead bark. **Redox Report**, v. 15, n. 6, p. 234-242, jul. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21208522/>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1179/135100010X12826446921789>

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 69-95, fev. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15061569/>. Acesso em: 05 dez. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(03)00117-0)

SHARMA, O. P.; SHARMA, S.; PATTABHI, V.; MAHATO, S. B.; SHARMA, P. D. A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 313-352, mai. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17453937/>. Acesso em: 19 fev. 2022. <https://doi.org/10.1080/10408440601177863>

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-387, jul. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383586607000512?via%3Dihub>. Acesso em: 19 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.01.008>

SILVA, S. M.; KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; CASTOLDI, R.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; PERALTA, R. A.; 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, fev. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913006583?via%3Dihub>. Acesso em: 29 nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.004>

SILVA, L. N.; ZIMMER, K. R.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, jul. 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.6b00184>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, jan. 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 30 mar. 2020.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, ago. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089158490000304X?via%3Dihub>. Acesso em: 05 dez. 2021. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00304-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00304-X)

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Avaliação da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 727-732, set. 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-20612008000300032&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 25 mai. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300032>

SOARES, T. S.; MOTA, J. H. Araucária – o pinheiro brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**. Ano II, n. 3, 2004.

SOUZA, M. O.; BRANCO, C. S.; SENE, J.; DALLAGNOL, R.; AGOSTINI, F.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Antioxidants**, v. 3, p. 24-37, mar. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665447/>. Acesso em: 26 out. 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox3010024>

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M. D. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, jul. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877406006649?via%3Dihub>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>

SUZUKI, S.; TAKADA, T.; SUGAWARA, Y.; MUTO, T.; KOMINAMI, R. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 82, n. 10, p. 1061-1064, out. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1955374/>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1991.tb01757.x>

TOO, Y. Y.; HO, S. K.; LIANG, J. Y.; HO, C. W.; TAN, C. P. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 290-295, mai. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814609011248?via%3Dihub>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064>

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS – TACO. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) – UNICAMP, 4ª ed. p. 64.

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 and Bioprocess Technology**, v. 12, p.193–197, out. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-018-2192-4>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2192-4>

TRUCHADO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; LARROSA, M.; ALLENDE, A. Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. **Food Control**, v. 24, n. 1-2, p. 78-85, mar.-abr. 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713511003616>. Acesso em: 31 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.006>

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, p. 1-6, jan. 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324452594_Ensaio_antioxidante_em_microplaca_d_o_poder_de_reducao_do_ferro_FRAP_para_extratos_de_algas. Acesso em: 08 jun. 2020. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24094.64322>

VANDEPUTTE, O. M.; KIENDREBEOGO, M.; RAJAONSON, S.; DIALLO, B.; MOL, A.; EL JAZIRI, M.; BAUCHER, M. Identification of Catechin as One of the Flavonoids from *Combretum albiflorum* Bark Extract That Reduces the Production of Quorum-Sensing-Controlled Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 243-253, jan. 2010. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/76/1/243>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1128/AEM.01059-09>

VAZQUEZ-ARMENTA, F. J.; BERNAL-MERCADO, A. T.; TAPIA-RODRIGUEZ, M. R.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; LOPES-ZAVALA, A. A.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A.; HERNANDEZ-OÑATE, M. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Quercetin reduces adhesion and inhibits biofilm development by *Listeria monocytogenes* by reducing the amount of extracellular proteins. **Food Control**, v. 90, p. 266-273, ago. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713518300872>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.041>

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: Padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 68-75, 2012. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/7902>. Acesso em: 08 jun. 2020.

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JESUDHASAN, P. R.; PILLAI, S. D.; PATIL, B. S. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 515-527, jul. 2010. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x>

WANG, S.; WANG, C.; GAO, L.; CAI, H.; ZHOU, Y.; YANG, Y.; XU, C.; DING, W.; CHEN, J.; MUHAMMAD, I.; CHEN, X.; HE, X.; LIU, D.; LI, Y. Rutin Inhibits *Streptococcus suis* Biofilm Formation by Affecting CPS Biosynthesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 379, jun. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00379/full>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00379>

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804-810, jan. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814607006462?via%3Dihub>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062>

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1801-1812, mai. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10552455/>. Acesso em: 06 dez. 2021. <https://doi.org/10.1021/jf9810416>

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, out. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17902627/>. Acesso em: 17 fev. 2022. <https://doi.org/10.1021/jf0715166>

YAMAGUCHI, L. F.; VASSÃO, D. G.; KATO, M. J.; MASCIO, P. D. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247, set. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942204006028?via%3Dihub>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.11.014>

YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; MASCIO, P. D. Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 615-620, mar. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942209000995?via%3Dihub>. Acesso em: 24 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.03.003>

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 9, p. 422-433, set. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224404001128?via%3Dihub>. Acesso em: 01 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.006>

YU, L.; SHANG, F.; CHEN, X.; NI, J.; YU, L.; ZHANG, M.; SUN, D.; XUE, T. The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis. **PeerJ**, v. 6, e5711, out. 2018. Disponível em: <https://peerj.com/articles/5711/>. Acesso em: 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.7717/peerj.5711>

ZHANG, L.; KONG, Y.; WU, D.; ZHANG, H.; WU, J.; CHEN, J.; DING, J.; HU, L.; JIANG, H.; SHEN, X. Three flavonoids targeting the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. **Protein Science**, v. 17, n. 11, p. 1971-1978, jan. 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1110/ps.036186.108>. Acesso em: 25 fev. 2021. <https://doi.org/10.1110/ps.036186.108>

ZHANG, Z. S.; LI, D.; WANG, L. J.; OZKAN, N.; CHEN, X. D.; MAO, Z.-H.; YANG, H.-Z. Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 17–24, out. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383586607001372?via%3Dihub>. Acesso em: 04 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.03.006>

ZHAO, D.-K.; SHI, Y.-N.; PETROVA, V.; YUE, G. G. L.; NEGRIN, A.; WU, S.-B.; D'ARMIENTO, J. M.; LAU, C. B. S.; KENNELLY, E. J. Jaboticabin and related

polyphenols from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) with anti-inflammatory activity for chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1513-1520, fev. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30675793/>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05814>

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, mar. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814698001022>. Acesso em: 30 mar. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

ZHOU, H. Y.; SHIN, E. M.; GUO, L. Y.; ZOU, L. B.; XU, G. H.; LEE, S. H.; ZE, K. R.; KIM, E. K.; KANG, S. S.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, n. 2-3, p. 239-248, out. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17662711/>. Acesso em: 05 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.005>