

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ISRAEL KELLER SILVA

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROSSOLÚVEIS DO ARILO CARNOSO
(ENDOCARPO) DA *Passiflora edulis f. flavicarpa* E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL**

FRANCISCO BELTRÃO

2021

ISRAEL KELLER SILVA

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROSSOLÚVEIS DO ARILO CARNOSO
(ENDOCARPO) DA *Passiflora edulis f. flavicarpa* E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL**

Extraction of water-soluble compounds from the fleshy aryl (endocarp) of *Passiflora edulis f. flavicarpa* and evaluation of its cytotoxic/antitumor activity.

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado como requisito para obtenção de Bacharel em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Düsman

Coorientadoras: Profa. Dra. Ana Paula de Oliveira Schmitz e Profa. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri

FRANCISCO BELTRÃO

2021

ISRAEL KELLER SILVA

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROSSOLÚVEIS DO ARILO CARNOSO
(ENDOCARPO) DA *Passiflora edulis f. flavicarpa* E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado como requisito para obtenção de Bacharel em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 20 de maio de 2021

Elisângela Düsman
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maria Henele Giovanetti Canteri
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ana Paula de Oliveira Schmitz
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso

FRANCISCO BELTRÃO

2021

“Dedico à Deus, minha família e aos meus amigos.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus, por toda a força e coragem que Ele me deu e me ajudou a não desistir nos momentos mais difíceis. A fé e as orações sempre me auxiliaram para manter concentração e disciplina necessária.

Quero agradecer à minha família, especialmente meus pais, Célia e Waltencir, que mesmo com as dificuldades me deram uma educação de excelente qualidade e me ensinaram a ser um homem com responsabilidades, respeito e valores que levarei por toda minha vida. Aos meus avós, Zilá e Israel, que são toda a base e os meus pilares, que sempre acreditaram em mim com todo amor e carinho. à minha irmã, Graziella, agradeço pelos conselhos, puxões de orelha, risadas e por cuidar de mim. Ao meu cunhado, Felipe, pelo incentivo e carinho para eu seguir meus sonhos. Às minhas tias, Angélica e Rosângela, que mesmo com a distância, zelam e oram por mim e tenho certeza que me apoiam em minhas decisões. Ao meu primo, Emanuel, que crescemos juntos e o considero como um irmão. Gratidão por tudo.

Especialmente, quero agradecer à minha grande amiga Patrícia, que sempre esteve lá por mim nos momentos mais difíceis e complicados durante a graduação e durante a realização deste projeto e que me ajudou demais a não desistir e continuar firme neste caminho. Igualmente a Larissa, Marina, Bruna e Kauany, obrigado por toda a amizade e carinho. E também agradecer aos meus amigos de laboratório, em especial ao Guilherme, que estiveram comigo e me auxiliaram nos experimentos.

Não posso deixar de agradecer a minha orientadora Elisângela, que não mediu esforços e teve toda paciência para me ajudar a realizar este trabalho. Também, à minha coorientadora Maria Helene, que me auxiliou demais nesta pandemia e não poupou seu tempo para me orientar nas horas que eu mais precisei. à minha coorientadora, Ana Paula, por aceitar a causa deste projeto e me fornecer todos os conhecimentos de engenharia necessários. Vocês são espelhos do profissional que me tornar!

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte do meu trajeto, obrigado por tudo e agradeço de coração.

RESUMO

O maracujá é originado na América tropical e possui mais de 150 espécies. O Brasil é grande produtor mundial da espécie *Passiflora edulis f. flavicarpa*, o maracujá amarelo. Ele possui cinco partes: o albedo, flavedo, o arilo carnoso (endocarpo), polpa e as sementes. O arilo carnoso apresenta benefícios a saúde humana, em função de seu conteúdo de compostos fenólicos, importantes para atividades antioxidantes, impedindo danos oxidativos e capazes de evitar doenças neurodegenerativas. Assim, o objetivo do presente estudo foi extrair compostos hidrossolúveis do arilo carnoso autoclavado da *P. edulis f. flavicarpa* e avaliar sua atividade citotóxica/antitumoral em células de carcinoma hepatocelular (CHC), na linhagem tumoral HuH7.5 humana, visando obter maiores conhecimentos sobre os efeitos celulares dessa parte do maracujá. O arilo carnoso do maracujá foi autoclavado, pois estudos prévios indicaram maiores quantidades de compostos fenólicos na farinha autoclavada do albedo do maracujá em relação a farinha do albedo sem tratamento. Para avaliar o efeito das variáveis experimentais de extração, foi empregado o planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional) 2², com duas variáveis independentes (tempo e temperatura de extração), sendo a variável resposta a concentração de compostos fenólicos. Os ensaios de extração foram realizados com o arilo carnoso seco e autoclavado, em banho ultrassônico, com uma agitação constante de 100 rpm na temperatura e no tempo de extração definidos pelo delineamento experimental. Os extratos aquosos foram filtrados a vácuo através de filtro tecido sintético de trama fechada (poliéster) e acondicionados em tubos de ensaio com concentração inicial de 0,025 g mL⁻¹. Os resultados obtidos a partir do DCCR 2² mostraram que na temperatura de 90,0 °C e no tempo de 27,0 min, foi definido o ponto ótimo da curva. Porém, foram utilizados os valores de 78,4 °C e 26,5 min para temperatura e tempo de extração, respectivamente, pois estes apresentaram os valores de máxima extração de compostos fenólicos, sendo ambas as variáveis avaliadas estatisticamente significativas. A análise físico-química deste extrato mostrou seu caráter ácido, com valor de pH 3,97, e com 10,54% de acidez total, além de 3,5 °Brix de sólidos solúveis, explicado pelo baixo estado de maturação do fruto, e sua umidade foi de 8,41%. O teste de citotoxicidade do MTT com as células HuH7.5 mostrou que todas as concentrações (exceto a de 300 µg mL⁻¹), nos três tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas) apresentaram absorvâncias médias maiores e diferentes estatisticamente do controle negativo, com efeito indutor da proliferação celular. Assim, os dados do presente estudo mostram que, apesar do elevado rendimento de extração (39,60%) e da presença de antioxidantes no extrato produzido (49,20% de inibição do DPPH em 30 minutos), outras linhagens tumorais devem ser avaliadas, buscando identificar melhor atividade biológica do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá produzido.

Palavras-chave: arilo autoclavado; delineamento experimental; linhagem Huh7.5; maracujá; teste do MTT.

ABSTRACT

Passion fruit originates in tropical America and has more than 150 species. Brazil is a biggest world producer of the *Passiflora edulis f. flavicarpa*, the yellow passion fruit. It has five parts: the albedo, flavedo, the fleshy aryl (endocarp), pulp and the seeds. The fleshy aryl presents benefits to human health, due to its content in phenolic compounds, which are important for antioxidant activities, preventing oxidative damage and capable of preventing neurodegenerative diseases. Therefore, the objective of the present study was to extract water-soluble compounds from the autoclaved fleshy aryl of *P. edulis f. flavicarpa* and evaluate its cytotoxic/antitumor activity in hepatocellular carcinoma (HCC) cells, in the human HuH7.5 tumor lineage, in order to obtain greater knowledge about the cellular effects of this part of the passion fruit. The fleshy aryl of passion fruit was autoclaved, because previous studies indicated higher amounts of phenolic compounds in the autoclaved flour of passion fruit albedo compared to untreated albedo flour. To evaluate the effect of the experimental extraction variables, the experimental design DCCR (central rotational composite design) 2^2 was used, with two independent variables (extraction time and temperature), the response variable being the concentration of phenolic compounds. The extraction tests were carried out in an ultrasonic bath, with a constant agitation of 100 rpm at the temperature and extraction time defined by the experimental design. The aqueous extracts were vacuum filtered through a synthetic woven filter (polyester) and placed in test tubes with an initial concentration of 0.025 g mL^{-1} . The results obtained from the DCCR 2^2 showed that at a temperature of $90.0 \text{ }^\circ\text{C}$ and at the time of 27.0 min, the optimal point of the curve was defined. However, the values of $78.4 \text{ }^\circ\text{C}$ and 26.5 min were used for temperature and extraction time, respectively, as they presented the maximum extraction values for phenolic compounds, both variables being statistically significant. The physical-chemical analysis of this extract showed that it has an acid character, with a pH value of 3.97 and 10.54% of total acidity, in addition to 3.5 ° Brix of soluble solids, which can be explained by the low state maturation period, and its moisture was 8.41%. The MTT cytotoxicity test with human hepatocellular carcinoma cells line HuH7.5, showed that all concentrations (except $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), in the three evaluation times (24, 48 and 72 hours) showed higher mean absorbances and statistically different from the negative control, with an effect of cell proliferation. Thus, the data from the present study show that, despite the high extraction yield (39.60%) and the presence of antioxidants in the extract produced (49.20% DPPH inhibition in 30 minutes), other tumor strains must be evaluated, seeking to identify the biological activity of the aqueous extract of the autoclaved fleshy aryl of the passion fruit produced.

Keywords: autoclaved aryl; experimental design; HuH7.5 lineage; passion fruit; MTT test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>).....	15
Figura 2 – Partes do maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>).....	16
Figura 3 – Curva padrão de ácido gálico para a concentração de compostos fenólicos totais....	25
Figura 4 – Distribuição dos resíduos: valores preditos pelo modelo em função dos valores observados no experimento do delinemaneto experimental da extração aquosa do arilo carnosos autoclavado do maracujá para a concentração de compostos fenólicos.....	30
Figura 5 – Superfície resposta para a concentração de compostos fenólicos em função da temperatura e tempo de extração.....	31
Figura 6 – Perfil de resposta para a concentração de compostos fenólicos em função da temperatura e tempo de extração.....	32
Figura 7 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado humano HuH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações do extrato aquoso do arilo carnosos autoclavado do maracujá.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis das variáveis independentes do DCCR 2 ²	23
Tabela 2 – Experimentos delineados pelo DCCR 2 ² com duas variáveis independentes.....	23
Tabela 3 – Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio do delineamento experimental com duas variáveis independentes.....	28
Tabela 4 – Efeitos para os fatores correspondentes para concentração de compostos fenólicos para delineamento experimental de extração sólido-líquido do arilo autoclavado do maracujá.....	29
Tabela 5 – ANOVA do modelo de concentrações de compostos fenólicos obtidos pelo delineamento experimental da extração sólido-líquido do arilo carnosu autoclavado do maracujá.....	31
Tabela 6 - Dados físico-químicos médios e desvio-padrão do extrato do arilo carnosu (endocarpo) do maracujá.....	33
Tabela 7 - Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado humano HuH7.5, tratadas com o extrato aquoso do arilo carnosu autoclavado do maracujá por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	OBJETIVOS.....	11
1.1.1	Objetivo Geral.....	11
1.1.2	Objetivos Específicos.....	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1	CÂNCER.....	13
2.2	PLANTAS MEDICINAIS.....	14
2.3	MARACUJÁ.....	15
2.4	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS.....	17
2.4.1	Planejamento Experimental.....	18
2.5	PLANTAS MEDICINAIS COMO ANTITUMORAIS.....	19
2.6	TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	20
3	METODOLOGIA.....	22
3.1	PREPARO DO ARILO DO MARACUJÁ.....	22
3.2	PREPARO DOS EXTRATOS.....	22
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE EXTRAÇÃO.....	23
3.4	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	24
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	25
3.6	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	25
3.7	RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	26
3.8	TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO ARILO CARNOSO AUTOCLAVADO DO MARACUJÁ.....	28
4.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	33
4.4	RENDIMENTO.....	34
4.5	TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são usadas pelo ser humano desde o começo de sua história, com papel importante no apoio à saúde das pessoas (GEORGE et al., 2016), como medicamentos caseiros em regiões tradicionais, ou como matéria-prima para a produção de fitoterápicos e aplicadas para fins terapêuticos (DE ALMEIDA, 2011; FIRMO et al., 2011; RIBEIRO, 2019).

Na última década, houve um aumento de interesse pelo uso de plantas medicinais, para evitar a “intoxicação” do corpo humano com substâncias sintéticas e químicas e pelo aperfeiçoamento de novas estratégias terapêuticas, além de auxiliar nos cuidados primários de saúde, juntamente com a medicina convencional (FIRMO et al., 2011; QUINN; HARVEY; EDRABA-EBEL, 2015).

O maracujá, pertencente à família Passifloraceae, por exemplo, é uma planta medicinal muito utilizada como sedativo para distúrbios de sono e ansiedade (ANDREATINI; DE ALMEIDA; FAUSTINO, 2010; ARANTES; LOPES; TIYO, 2017). Seus subprodutos (casca, sementes e arilo carnosos - endocarpo) possuem potencial benéfico à saúde, em função de seu conteúdo em carboidratos e proteínas, além de compostos fenólicos, importantes para as atividades antioxidantes, fibras solúveis e ácidos graxos (CANTERI et al., 2010; MALACRIDA; JORGE, 2012; MAXWELL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006; TUOPING et al., 2014). Estudos também apresentaram atividade antitumoral (MOTA et al., 2018; SILVA et al., 2012).

A extração é um dos métodos mais empregados para isolamento de produtos ativos encontrados em plantas medicinais (PONTES et al., 2018). Neste processo ocorre a transferência de massa do composto desejado para a solução com a qual tem mais afinidade. A extração sólido-líquido, por exemplo, é uma das principais formas de extração utilizada em plantas e frutos, na qual os princípios ativos solúveis do material sólido são extraídos por um solvente líquido seletivo a esses (VEGGI, 2009). Métodos eficazes de extração devem melhorar a recuperação de compostos alvo, com pouca quantidade de degradação ou modificação de seu estado natural (FERREIRA, 2013; GUINDANI et al., 2014). Cada método contém variáveis de processo capazes de influenciar na extração. Assim sendo, é fundamental designar as condições experimentais que propiciem uma extração seletiva e com boa recuperação dos compostos de interesse.

O delineamento experimental é um procedimento efetivo para o planejamento dos experimentos de otimização dos métodos extrativos (OLIVEIRA, 2014). O planejamento

fatorial pode ser destacado, pois possibilita avaliar paralelamente o efeito de um extenso número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PEARLTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

O rendimento da extração dos componentes da planta varia de acordo com as condições em que o método de extração ocorre. Como exemplo pode-se citar a seleção do solvente, a ação mecânica e a temperatura, que são importantes fatores (WONGKITTIPONG et al., 2004), principalmente com relação à qualidade do extrato obtido.

Uma das formas de se avaliar a qualidade dos extratos obtidos é testar suas atividades biológicas. O teste de citotoxicidade do MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 brometo de difenil tetrazólio), por exemplo, avalia o efeito tóxico de novos medicamentos, drogas e extratos em linhas celulares (ROGERO et al., 2006; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

O câncer é a doença que mais causa mortes no mundo nos últimos anos, e a barreira mais importante para o aumento de expectativa de vida em todos os países do mundo no século 21, sendo um problema de saúde pública, prejudicando toda a sociedade (FEITOSA; PONTES, 2011; BRAY et al., 2018). O carcinoma hepatocelular (CHC), por exemplo, constitui 75-85% dos tumores hepáticos primários (entre eles a linhagem humana HuH7.5), sendo o sexto câncer mais prevalente em todo o mundo e a quarta causa de morte relacionada ao câncer, representando assim um problema de saúde pública global (GLOBOCAN, 2018). Devido a algumas insuficiências no tratamento do câncer pelos métodos convencionais, muitas pessoas buscam terapias alternativas, como uso de plantas medicinais, visto que têm sido uma das grandes fontes de novos compostos com atividade citotóxica/antitumoral e farmacológica (CASSILETH; DENG, 2004; DE ALMEIDA et al., 2005; DE MELO et al., 2011).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a extração de compostos fenólicos do arilo do maracujá e os efeitos citotóxicos/antitumorais do extrato hidrossolúvel do arilo carnosos (endocarpo) autoclavado do maracujá, frente às células HuH7.5.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a extração de compostos fenólicos do arilo do maracujá e os efeitos citotóxicos/antitumorais do extrato hidrossolúvel do arilo carnosos (endocarpo) autoclavado do maracujá, frente às células HuH7.5.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Aplicar a técnica de extração sólido-líquido por infusão em água no endocarpo do maracujá para a obtenção do extrato;
- Avaliar condições adequadas para o método de extração avaliando os parâmetros temperatura e tempo de extração para a maior quantidade de concentração compostos fenólicos no extrato;
- Caracterizar o extrato produzido em termos físico-químicos;
- Recuperar o material sólido do extrato por meio da liofilização;
- Calcular o rendimento do extrato liofilizado;
- Avaliar a atividade citotóxica/antitumoral do extrato em cultura de células tumorais HuH7.5, *in vitro*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

A palavra câncer foi estabelecida por Hipócrates (460-370 a. C.), médico grego, o qual considerou os termos, Karkinos e Karkinoma, utilizados para caracterizar lesões tumorais ulcerosas e não ulcerosas. A expressão Karkinos, em grego, quer dizer caranguejo, o que leva à suspeita de que a escolha aconteceu devido a circunstância do câncer se grudar a partes específicas do corpo hospedeiro, assim como o crustáceo (DECAT; ARAUJO, 2010).

A definição mais antiga do câncer é datada por volta de 1600 a. C., apesar de que não fosse o termo utilizado na época. Foi constada em um papiro egípcio, em que foram apontados oito casos de tumores (DECAT; ARAUJO, 2010).

Nos dias atuais, o câncer é descrito como o crescimento desordenado de células, com a tendência de invadir tecidos e órgãos próximos, caracterizado pela perda do comando da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas orgânicas (INCA, 2019).

O câncer é, nos últimos anos, a doença que mais causa mortes no mundo e a barreira mais importante para o aumento de expectativa de vida em todos os países do mundo no século 21, evidenciando um problema de saúde pública, requerendo uma maior atenção dos governantes e dos profissionais da saúde (BRAY et al., 2018). Em 2013, no Brasil, 16,8% dos óbitos foram relacionados ao câncer, tornando-se segunda causa de mortalidade (MALTA et al., 2019). É uma patologia prejudicial não apenas ao indivíduo, mas para toda a sociedade, através da diminuição do potencial de trabalho humano e do impacto na economia devido aos grandes custos envolvidos com assistência à saúde, pesquisa e educação (FEITOSA; PONTES, 2011).

O desenvolvimento de formação do câncer é conhecido como carcinogênese e, geralmente, ocorre vagarosamente, podendo demorar anos para que uma célula cancerígena se espalhe e dê origem a um tumor visível. Esse desenvolvimento é constituído por três estágios: de iniciação, no qual os genes são expostos à ação dos agentes cancerígenos; de promoção, em que os agentes oncopromotores agem na célula já modificada; e de progressão, determinado pelo aumento descontrolado e irreversível da célula (INCA, 2019).

O carcinoma hepatocelular (CHC), por exemplo, constitui 75-85% dos tumores hepáticos primários (dentre os quais a linhagem humana HuH7.5) e, de acordo com Agência Internacional do Câncer correspondendo ao sexto câncer mais prevalente em todo o mundo e a

quarta causa de morte relacionada ao câncer, representando assim um problema de saúde pública global (GLOBOCAN, 2018). O transplante de fígado está entre as terapias mais eficazes disponíveis, indicado no estágio inicial da doença, seguido de ressecção cirúrgica ou terapias transarteriais (SIM; KNOX, 2018), além de medicamentos para tumores. No entanto, como o CHC é geralmente diagnosticado em sua fase tardia, o tratamento com quimioterapia é desafiador devido à sua natureza muito agressiva, que envolve baixas taxas de resposta, resistência a medicamentos, efeitos colaterais e baixa taxa de recuperação (SANTOS; ELISABETSKY, 1999; ZHANG et al., 2019). Muitos agentes antineoplásicos não são exclusivos para as células cancerígenas e também podem deteriorar as células saudáveis, principalmente aquelas com rotatividade acelerada, como as células imunológicas (DE ALMEIDA et al., 2005). Por essa razão, muitas pessoas com câncer em todo o mundo buscam terapias alternativas de tratamento, como uso de plantas (CASSILETH; DENG, 2004).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são manipuladas pelo ser humano desde o começo de sua história, tendo papel fundamental no apoio à saúde das pessoas (GEORGE et al., 2016), utilizadas como medicamentos caseiros em regiões tradicionais ou, como matéria – prima para produção de fitoterápicos (FIRMO et al., 2011; RIBEIRO, 2019). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, aplicadas para fins terapêuticos (DE ALMEIDA, 2011).

A maioria da população mundial aprecia os métodos tradicionais com relação aos cuidados com a saúde e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% desta população utiliza algum tipo de erva medicinal, especialmente em países em desenvolvimento (FIRMO et al., 2011).

No Brasil, devido à grande biodiversidade (20 a 22% de todas as espécies descobertas no mundo, aproximadamente), há um significativo interesse no uso de fitoterápicos para tratamento de várias doenças. Porém, apesar dessa biodiversidade, o mercado brasileiro ainda é limitado, representando menos de 5% do mercado mundial de medicamentos brasileiros (DUTRA et al., 2016).

Houve um aumento do interesse pelo uso de plantas medicinais e de tratamentos fitoterápicos, devido ao aperfeiçoamento de novas estratégias terapêuticas, além de auxiliar nos cuidados primários de saúde, juntamente com a medicina convencional (FIRMO et al., 2011).

O conhecimento popular revela um interesse em medicamentos derivados de plantas ou fitoterápicos, com a intenção na atuação na terapia moderna, como tratamento de doenças agudas e crônicas (QUINN; HARVEY; EDRABA-EBEL, 2015). Avalia-se que aproximadamente 30% dos medicamentos terapêuticos existentes sejam derivados de origens naturais, especialmente plantas (DUTRA et al., 2016).

A indústria farmacêutica, juntamente com a medicina, tem o intuito de validar as investigações populares em relação ao uso de plantas medicinais, além de buscar desenvolver estudos com objetivo de encontrar novos princípios ativos e melhorar as descobertas já existentes sobre plantas. Essa linha de estudo gera técnicas de isolamento e produção de medicamentos (GURIB-FAKIM, 2006).

2.3 MARACUJÁ

Originário da América tropical, o maracujá possui mais de 150 espécies da família Passifloraceae (FILHO; LEITE; RAMOS, 2020). No entanto, as espécies mais utilizadas no Brasil e no mundo são de maracujá roxo (*Passiflora edulis*), maracujá doce e maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Mesmo com essa enorme diversidade, o maracujá amarelo ou azedo (Figura 1) é o mais cultivado e vendido mundialmente. O fruto pode ser consumido *in natura* ou na forma de suco concentrado, polpa e geleia (DA CONCEIÇÃO; JOSÉ; PIRES, 2011).

Figura 1 - Maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)



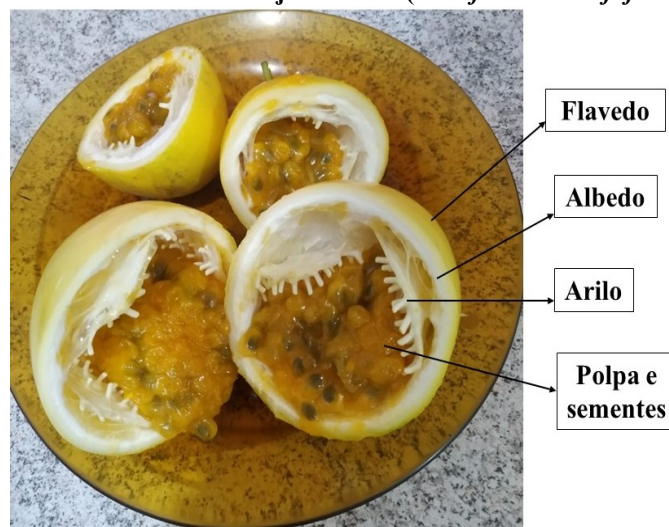
Fonte: A autoria própria (2021)

De acordo com Zerk et al. (2010), o Brasil é um grande produtor mundial do maracujá e seu valor comercial foi apenas percebido no fim da década de 60. Ele pode ser encontrado em

todas as regiões do país, porém o Nordeste apresenta liderança em sua produção (MELLETTI, 2011).

O fruto pode ser dividido em cinco partes (Figura 2): albedo, flavedo, polpa, arilo e sementes. O albedo (mesocarpo) corresponde a parte interna do fruto, normalmente com coloração branca. O flavedo (exocarpo) corresponde a parte externa do fruto, de coloração verde, amarelo ou laranja, quando maduro. O conjunto de flavedo e albedo é conhecido trivialmente como casca. O arilo é uma película que envolve a polpa (endocarpo) e as sementes (FAEP, 2020).

Figura 2 – Partes do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)



Fonte: Autoria própria (2021)

Além de ser usado como calmante, o maracujá também é sedativo para distúrbios de sono, ansiedade e estresse nervoso (ANDREATINI; DE ALMEIDA; FAUSTINO, 2010; ARANTES; LOPES; TIYO, 2017). A casca do maracujá e o arilo carnosos apresentam proteínas e possuem potencial benéfico à saúde, podendo ser mais pesquisado pelas indústrias, melhorando a complementação alimentar (OLIVEIRA et al., 2002; CANTERI et al., 2010). A parte do albedo da casca pode trazer vantagens para a saúde, pois apresenta diminuição no LDL do colesterol e da glicemia (BARBALHO et al., 2012). Pode também ajudar no tratamento de obesidade e *Diabetes mellitus* tipo 2 (JANEIRO et al., 2008). Além disso, segundo Gondim et al. (2005), a casca é rica em vitamina B3, ferro, cálcio e fósforo e também em fibras solúveis, principalmente pectina, com características das fibras dietéticas, melhorando a redução de peso corporal, por bloqueio de nutrientes no intestino (MAXWELL et al., 2012; TUOPING et al., 2014). A pectina também evita a absorção de metais pesados e toxinas, melhorando a biodisponibilidade de ferro no organismo (SERGUNCHENKO; KOLENCHENKO;

KHOTIMCHENKO, 2007). Inclusive, de acordo com Silva et al. (2012), propriedades antitumorais *in vivo* podem ser destacadas na pectina. Os autores verificaram a redução do Sarcoma S-180 (câncer de mesoderme) com a fração polissacarídica extraída com água quente da casca do maracujá.

É importante destacar que o fruto, as folhas e o endocarpo do maracujá apresentam compostos fenólicos, importantes para atividades antioxidantes, impedindo danos oxidativos e capazes de evitar condições inflamatórias, envelhecimento e doenças neurodegenerativas (OLIVEIRA et al., 2016; DA SILVA et al., 2013; CANTERI et al., 2010).

As sementes do fruto apresentam elevadas quantidades de fibra e óleo, que por sua vez, apresenta alta taxa de ácidos graxos, como ácido linoleico, oleico, palmítico e esteárico, que podem ser manipulados como agentes condicionadores da pele e do cabelo e na estruturação de produtos de maquiagem. Outra propensão atual é a utilização do óleo na produção de biodiesel (MALACRIDA; JORGE, 2012). Além disso, segundo Mota et al. (2018), as sementes do maracujá apresentaram atividade antitumoral *in vivo* devido à geração de espécies reativas do oxigênio intracelulares por meio de danos mitocondriais, causando danos oxidativos em proteínas, no ácido desoxirribonucleico (DNA), parada do ciclo celular e apoptose.

2.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS

A extração é um dos métodos mais empregados para isolamento de produtos ativos encontrados em plantas medicinais e alimentos bioativos. Métodos eficazes de extração devem melhorar a separação de compostos alvo, com pouca quantidade de degradação ou modificação de seu estado natural (GUINDANI et al., 2014).

Grande parte das separações é feita por evaporação do solvente extrator quando, depois da extração, o extrato não possui princípios ativos termossensíveis. Se o aumento da temperatura causar algum tipo de degradação aos compostos encontrados no extrato, pode-se aplicar a técnica de liofilização, conservando assim as propriedades nutritivas do produto, pois as membranas das células não se rompem com a perda do vapor de água (GARCIA, 2009).

O rendimento da extração dos componentes da planta é influenciado pelas condições em que o método de extração ocorre. A seleção do solvente, a ação mecânica e a temperatura são fatores importantes. Além disso, a extração sofre influências da estrutura molecular do soluto, a localização, a dimensão e composição do produto (WONGKITTIPONG et al., 2004).

Por causa da diversidade de compostos químicos das plantas em folhas, flores e raízes e a relevância em relação a produtos medicinais, o aperfeiçoamento de métodos vem sendo avaliado para obtenção de extratos de plantas, mostrando-se como uma nova opção de medicamentos, formando a base de aprimorados sistemas conhecidos da medicina presentes por vários anos e fornecendo novos remédios (VEGGI, 2009).

A extração sólido-líquido com ajuda de solvente, por exemplo, ocorre quando os compostos solúveis do material sólido são extraídos por um solvente líquido. Neste processo, o solvente entra nos capilares do composto estudado, promovendo sua dissolução e gera uma solução de alta concentração (FERREIRA, 2013). Dentre os processos de extração sólido-líquido, pode-se salientar: de maceração, percolação, extração com Soxhlet, ultrassom, extração com fluido supercrítico e extração com líquido pressurizado (MELECCHI, 2005). Para aumentar transferência de massa e o rendimento das extrações sólido-líquido, existem algumas técnicas, como a moagem da matéria-prima, para aumentar a área de contato entre matriz e solvente. Altas temperaturas também são importantes no processo, auxiliando no aumento da solubilidade do soluto no solvente. No entanto, várias matérias-primas são termicamente sensíveis, devendo-se considerar o limite máximo de temperatura para evitar sua degradação (FERREIRA, 2013; SAWADA, 2012).

2.4.1 Planejamento Experimental

Determinadas atividades biológicas relacionadas a plantas, por exemplo, aplicam-se a grupos exclusivos de componentes químicos, os princípios ativos. A extração destes compostos é possível ser realizada por diversos métodos, e cada método contém variáveis de processo capazes de influenciar na extração. Assim sendo, é fundamental designar as condições experimentais que propiciem uma extração seletiva e com boa recuperação dos compostos de interesse. O delineamento experimental é uma ferramenta efetiva para o planejamento dos experimentos de otimização dos métodos extrativos (OLIVEIRA, 2014).

Entre as diversas categorias encontradas de planejamento experimental, o sistema de planejamento fatorial pode ser evidenciado, pois é uma ferramenta utilizada para esclarecer a influência dos fatores ou variáveis independentes sobre as respostas desejadas, baseado em princípios estatísticos que levam a maior segurança no fornecimento de informações em relação a métodos aleatórios (PEARLTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005). Esse planejamento pode averiguar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência (níveis de fatores), sendo

possível avaliar todas as maneiras possíveis de combinação dos níveis de cada variável em cada ensaio. Em princípio, caso exista n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2, ..., e n_k do fator k , o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experimentos. Esta é a quantidade mínima para que se tenha um planejamento fatorial completo. Existindo k fatores, ou seja, k variáveis conduzidas pelo experimentador, o planejamento de dois níveis necessitará da realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo assim chamado de planejamento fatorial 2^k (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), fundamentado em planejamentos fatoriais, revela-se como um instrumento para o estudo do ponto ótimo de trabalho através de um planejamento completo. O procedimento é realizado com a assistência da metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*), uma técnica de otimização. Esta técnica apresenta modelagem e deslocamento, que são duas etapas distintas, através de inúmeras repetições, visando atingir uma região ótima da superfície (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

2.5 PLANTAS MEDICINAIS COMO ANTITUMORAIS

A diversidade de plantas é uma fonte significativa de novas moléculas. Mais de 60% dos agentes anticâncer usados são provenientes direta ou indiretamente de fontes naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Plantas medicinais têm sido uma das grandes fontes de novos compostos com atividade farmacológica (DE MELO et al., 2011). De acordo com Silva (2008), metade de drogas usadas em experiências clínicas foram isoladas de fontes naturais. Além disso, produtos naturais originários de plantas como compostos fenólicos (flavonoides, por exemplo), têm ganhado importância ao longo dos anos, por causa das suas múltiplas características farmacológicas, abrangendo efeitos citotóxicos e antioxidante. A relevância do estudo das plantas na atividade antitumoral está relacionada à sua contribuição com elementos que podem ser aplicados diretamente na terapêutica ou ainda constituir matéria-prima para manipulação, e ainda ser utilizado na indústria para obtenção de princípios ativos e pioneiros de sínteses para esse tipo de fármacos (SILVA, 2008). Os compostos fenólicos, por exemplo, presentes em várias plantas, são conhecidos por seus efeitos antioxidantes inibidores da atividade de crescimento tumoral, em linhagens de células tumorais (ANGELO; JORGE, 2007).

Os fármacos mais utilizados na terapêutica do câncer são escolhidos por suas capacidades de manipulação da proliferação celular. Contudo, existem pesquisas com medicamentos que apresentam atividades características em combate a alguns mecanismos metabólicos de células tumorais, além de estudos que impedem a neovascularização tumoral e instigam a essas células a apoptose (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Conforme Simonetti (2004), grande parte os fármacos empregados no tratamento de tumores atuam sobre o DNA, avariando-o ou inibindo sua replicação.

Com o objetivo de tratar várias doenças, inclusive o câncer, existe um aumento significativo do uso de fitoterápicos na medicina. Por causa disso, tanto os profissionais da saúde, como a população, precisam de informações seguras e claras sobre as propriedades e possibilidades desse uso (ZARBETO-SABEC et al., 2019).

2.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL

Com a fiscalização cada vez mais rígida no que diz respeito ao uso de animais em laboratório, é necessário o desenvolvimento e padronização de testes *in vitro*. Espera-se que esses testes tenham a capacidade de identificar a toxicidade de substâncias para aplicação futura em seres humanos, especialmente o uso de biomateriais sem provocar reações incompatíveis ao organismo. Existem vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de biomateriais, utilizando-se culturas celulares, com diferentes mecanismos para averiguação das modificações celulares. O parâmetro mais empregado para classificar a toxicidade é a viabilidade celular, representada com o auxílio de corantes vitais, podendo fazer distinção entre células lesadas ou mortas e vivas, pela intensidade da coloração da cultura (ROGERO et al., 2003).

O teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] fundamenta-se em um modelo para analisar a viabilidade celular, de maneira rápida e precisa, baseando-se em uma reação colorimétrica. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por desidrogenases mitocondriais, transformando um composto com coloração amarela para um composto violeta, sendo esse chamado de formazan. A quantidade de cristais formados é proporcional ao número de células vivas. Portanto, ao fim da reação, quanto mais escura a coloração, maior é a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Ensaio com cultura de células apresentam uma ferramenta fundamental de averiguação básica, que servem para várias áreas de investigação, como a imunologia, a genética e até mesmo a toxicologia *in vitro* (LEWINSKA et al., 2007). Os testes *in vitro* podem

proporcionar dados rápidos e financeiramente acessíveis sobre as interações biológicas (ROGERO et al., 2006.). Além disso, esses também possuem vantagens em relação aos testes *in vivo*, tais como a capacidade de ampliar o número de variáveis experimentais e atingir dados significativos de maneira mais simples e ágil (ROGERO et al., 2003).

3 METODOLOGIA

3.1 PREPARO DO ARILO DO MARACUJÁ

Os maracujás foram adquiridos no comércio local da cidade de Francisco Beltrão – Paraná. Cerca de 2 kg de frutos foram lavados em água corrente e cortados ao meio com auxílio de facas, sendo a polpa (suco e sementes) removida para a separação do arilo carnosos (endocarpo). Em seguida, o endocarpo foi lavado em água corrente, retirado o excesso de água com papel toalha e seco em estufa de circulação de ar por 24 horas (até massa constante), na temperatura de 50 °C. Após, foi moído em moinho de facas e o pó foi tamisado em peneira de 0,69 mm de abertura para minimizar a influência do tamanho das partículas na extração, seguido pelo tratamento em autoclave vertical (marca: Phoenix Equipamento Científico, modelo: AV75) durante 30 minutos a 120 °C. A autoclavagem do material foi realizada baseada em estudos prévios no laboratório (dados não mostrados) e nos resultados de Marena (2015), que indicaram maiores quantidades de compostos fenólicos na farinha autoclavada do albedo do maracujá em relação a farinha do albedo sem tratamento. Por fim, a farinha do arilo foi armazenada em recipiente hermético a temperatura ambiente e utilizada como matéria prima para a extração.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Para a extração sólido-líquido, foram adicionados 0,25 g do arilo carnosos moído e autoclavado do maracujá em 10 mL do solvente extrator (água Mili Q), sendo o processo realizado por infusão. A mistura foi mantida em banho ultrassônico, com uma agitação constante de 100 rpm na temperatura e no tempo de extração definidos pelo planejamento experimental, em um recipiente fechado, para não ocorrer evaporação.

Em seguida, os extratos aquosos foram filtrados a vácuo através de filtro tecido sintético de trama fechada (poliéster) e acondicionados em tubos de ensaio com concentração inicial de 0,025 g mL⁻¹.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO

No campo do estudo da determinação das condições adequadas de extração sólido-líquido por infusão do arilo carnosos do maracujá, foi feito um planejamento experimental. As condições de extração são exibidas na Tabela 1, na qual estão indicados os níveis codificados -1,41 e +1,41, como pontos extremos do processo de extração (pontos axiais), -1 e +1 como os pontos mínimos e máximos do planejamento fatorial, respectivamente, definidos para o processo experimental, e 0 representando o ponto central das condições de extração. Dessa forma, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², com 2 variáveis independentes (temperatura e tempo de extração) em dois níveis e triplicata no ponto central.

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes do DCCR 2²

Discriminantes			Níveis				
Variáveis independentes	Unidade	Notação	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura	° C	X1	10,0	21,6	50,0	78,4	90,0
Tempo	min.	X2	3,0	6,5	15,0	23,5	27,0

Fonte: Aatoria própria (2021)

Na Tabela 2, encontram-se os ensaios que foram realizados, relacionando as respectivas temperaturas e os tempos de extração.

Tabela 2: Experimentos delineados pelo DCCR 2² com duas variáveis independentes

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	Temperatura	Tempo de extração	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min.)
1	-1	-1	21,6	6,5
2	-1	+1	21,6	23,5
3	+1	-1	78,4	6,5
4	+1	+1	78,4	23,5
5	-1,41	0	10,0	15,0
6	+1,41	0	90,0	15,0
7	0	-1,41	50,0	3,0
8	0	+1,41	50,0	27,0
9 C	0	0	50,0	15,0
10 C	0	0	50,0	15,0
11 C	0	0	50,0	15,0

Fonte: Aatoria própria (2021)

A fim de identificar as condições operacionais que favorecem o processo de extração em estudo, foi avaliada como variável resposta a determinação da concentração de compostos fenólicos, que indiretamente indica a atividade antioxidante do extrato obtido nas diferentes combinações do planejamento.

A análise estatística da variável resposta foi realizada pelo teste de variância ANOVA para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a predição ou não do modelo matemático. Os coeficientes do modelo foram analisados pelo teste t de Student a 5% de significância ($p < 0,05$). Além disso, a análise dos resultados foi feita pela distribuição de resíduos e superfície de resposta.

Após feita toda análise no planejamento experimental, o ensaio (extrato) que obteve melhor resultado de compostos fenólicos, de acordo com a temperatura e tempo de extração, foi utilizado para as demais avaliações.

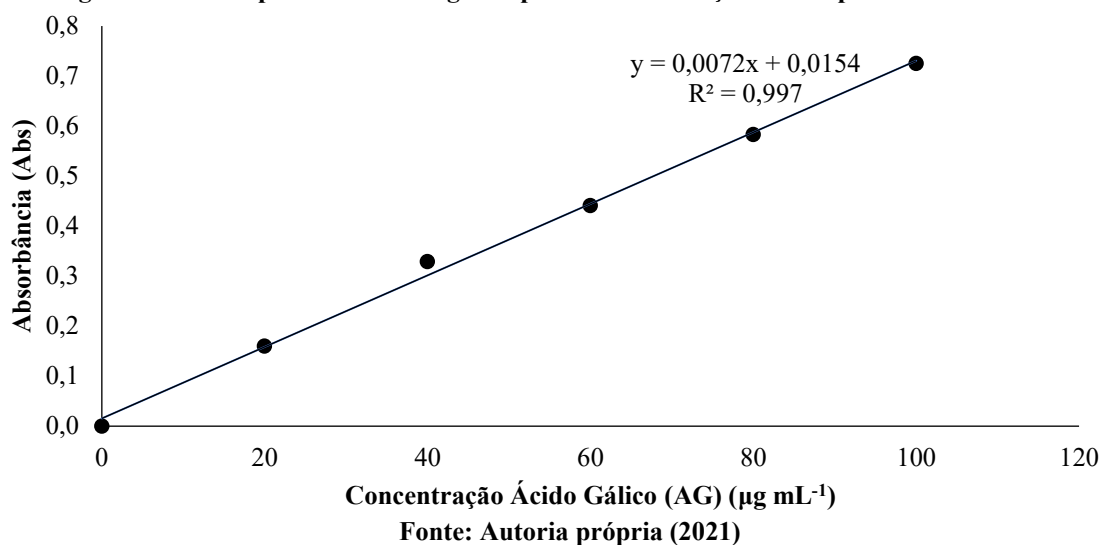
3.4 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Para a determinação de teor de fenólicos totais dos extratos infusionados do endocarpo do maracujá foi feito o ensaio colorimétrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), com adaptações.

As amostras dos extratos aquosos do endocarpo do maracujá foram previamente diluídas em água Mili Q (1:1) mL. Após, foram adicionados 0,3 mL dessa diluição e 0,7 mL de água Mili Q em tubos de ensaio, que foram misturados com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu puro e 7,5 mL de Mili Q, sendo agitado no vórtex. Depois de 3 min, foi adicionado 1,0 mL de solução de carbonato de sódio saturado a 20% (m v⁻¹). As amostras permaneceram em repouso por 30 min em temperatura ambiente e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 765 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. A estimativa dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada em triplicata.

Para expressar os resultados, foi usada a curva padrão de ácido gálico (AG) apresentada na Figura 3, com os valores de concentração equivalentes a 0, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\text{Abs} = 0,0072\text{AG} + 0,0154$) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por g de amostra (mg AG g^{-1}).

Figura 3 – Curva padrão de ácido gálico para a concentração de compostos fenólicos totais



3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos do arilo carnosos do maracujá foi utilizado o método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que consiste na alteração da coloração violeta-escura característica do composto, de acordo com Brand-Williams (1995). Amostra de extrato aquoso do arilo autoclavado foi diluída em água Mili Q (1:1) mL. Após, 100 µL dessa diluição foram homogeneizados com 3900 µL de solução DPPH na concentração de 60 µmol L⁻¹. A absorbância foi medida a 515 nm em triplicata após a mistura ter descansado durante 30 min na ausência de luz.

A determinação da atividade antioxidante foi feita por meio da porcentagem de inibição (%I) em relação ao controle, conforme a Equação 1, em que (Ac) representa a absorbância do controle DPPH e (Aa) representa a absorbância da amostra.

$$\%I = \frac{(Ac - Aa)}{Ac} * 100 \quad (1)$$

3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas do extrato do arilo carnosos do maracujá foram realizadas seguindo as técnicas sugeridas pelo manual de Métodos Físico-químicos para análises de

alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008), determinando-se: pH, acidez total titulável e sólidos solúveis.

Também foi determinada a composição centesimal aproximada do endocarpo do maracujá, estimada pelo teor de umidade, por secagem direta a 105 °C durante 48 horas.

3.7 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

Para a determinação do rendimento máximo da extração, 4 g da farinha do arilo autoclavado foram misturadas com 160 mL de água Mili Q na temperatura e no tempo de 78,4 °C e 23,5 min., respectivamente. Após, o extrato aquoso foi colocado em placas de petri e as mesmas foram guardadas em *freezer* para congelamento na temperatura de -18° C durante 5 horas. Em seguida, as placas de petri congeladas com o extrato foram colocadas em liofilizador durante 24 horas. O extrato aquoso do endocarpo autoclavado liofilizado foi armazenado em tubos de ensaios devidamente fechados em temperatura ambiente. O cálculo do rendimento foi feito a partir da massa de extrato livre do solvente obtida em relação à massa inicial do arilo autoclavado submetido a extração, conforme a Equação 2.

$$\text{Rendimento máximo} = \frac{\text{massa final do extrato}}{\text{massa inicial da amostra}} * 100 \quad (2)$$

3.8 TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL

As células Huh7.5 humanas, derivadas do carcinoma hepatocelular (CHC), foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementando com 15% de soro bovino fetal, e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

O ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral foi realizado pelo MTT de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983). Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas 3,0 x 10⁴ células HuH7.5. Após estabilização por 24 horas, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100 µL de meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS – 150 µM), (controle positivo - CO+) e tratamentos com o extrato aquoso autoclavado do endocarpo do maracujá, diluído em meio de cultura, nas concentrações finais de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg mL⁻¹.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura acrescido de MTT (0,364 mg mL⁻¹). As placas foram incubadas por mais quatro horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 560 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*), seguida do teste de Dunnet, pelo *software Action Stat*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de *p* menor que 0,05.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento e a absorbância do controle negativo, de acordo com a Equação 3.

$$Viabilidade\ Celular = \frac{absorb\ancia\ do\ tratamento}{absorb\ancia\ do\ controle\ negativo} * 100 \quad (3)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DO ARILO CARNOSO AUTOCLAVADO DO MARACUJÁ

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos, obtidos pela realização do planejamento experimental com as variáveis independentes tempo de extração e temperatura, são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio do delineamento experimental com duas variáveis independentes

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente			
	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)	Compostos Fenólicos (mg g ⁻¹)			
			1	2	3	Média ± desvio-padrão
1	21,6	6,5	14,43	14,43	14,17	14,34 ± 0,15
2	21,6	23,5	14,65	14,28	14,28	14,40 ± 0,21
3	78,4	6,5	16,84	16,50	16,58	16,64 ± 0,18
4	78,4	23,5	18,06	17,90	17,84	17,93 ± 0,11
5	10,0	15,0	13,65	13,80	13,95	13,80 ± 0,15
6	90,0	15,0	16,35	15,87	15,80	16,01 ± 0,30
7	50,0	3,0	17,47	17,35	17,46	17,43 ± 0,07
8	50,0	27,0	16,32	15,98	15,57	15,96 ± 0,37
9 C	50,0	15,0	16,68	16,61	16,47	16,59 ± 0,11
10 C	50,0	15,0	15,35	15,39	15,32	15,35 ± 0,03
11 C	50,0	15,0	17,10	16,73	16,58	16,91 ± 0,26

Fonte: Autoria própria (2021)

No que diz respeito aos resultados de concentração de compostos fenólicos à influência dos fatores de operação (tempo de extração e suas respectivas temperaturas), sugere-se um modelo em termos lineares e quadráticos, bem como as interações das variáveis de acordo com a Equação 4:

$$R = a_0 + a_1q_1 + a_2q_2 + b_{12}q_1q_2 + b_{11}q_1^2 + b_{22}q_2^2 \quad (4)$$

em que:

R = resposta experimental (concentração de compostos fenólicos (mg g⁻¹));

q₁ = valor de parâmetro operacional ajustado (temperatura de extração);

q_2 = valor de parâmetro operacional ajustado (tempo de extração);

$a_0, a_1, a_2, b_{12}, b_{11}, b_{22}$ = são parâmetros ajustados do modelo que definem a regressão polinomial de segunda ordem.

Na Tabela 4 são encontrados os valores dos coeficientes lineares e quadráticos para as concentrações dos compostos fenólicos. Além disso, os valores dos efeitos principais, os coeficientes para cada variável estudada, interações, erro padrão e os valores encontrados pelo teste t de Student ($p < 0,05$) são apresentados de acordo com as concentrações dos compostos fenólicos, em que os termos lineares estão relacionados à letra q_n e os termos quadráticos com a letra $(q_n)^2$.

Tabela 4 – Efeitos para os fatores correspondentes para concentração de compostos fenólicos para delineamento experimental de extração sólido-líquido do arilo autoclavado do maracujá

Fatores	Coefficientes	Valor	Desvio padrão	t _{calculado}	p
Média *	a_0 *	16,24 *	0,146 *	111,23 *	< 0,0005 *
Temperatura (q_1) *	a_1 *	1,10 *	0,090 *	12,34 *	< 0,0005 *
Temperatura (q_1) ² *	b_{11} *	-0,671 *	0,107 *	-6,27 *	< 0,0005 *
Tempo (q_2)	a_2	-0,107	0,089	-1,19	0,245
Tempo (q_2) ² *	b_{22} *	0,231 *	0,107 *	2,16 *	0,041 *
$q_1 \times q_2$ *	b_{12} *	0,275 *	0,126 *	2,17 *	0,040 *

* Resultado estatisticamente significativo (Teste t de Student, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2021)

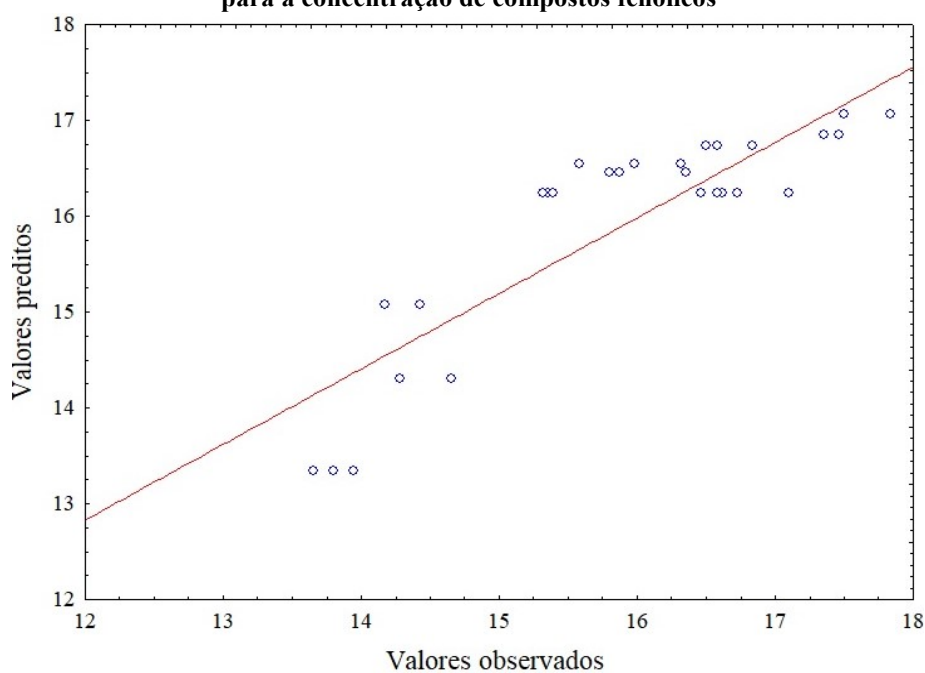
É possível notar que as variáveis temperatura e tempo foram estatisticamente significativas, em que a variável temperatura apresentou os fatores lineares e quadráticos significativos para o intervalo de confiança avaliado, e a variável tempo evidenciou apenas o fator quadrático significativo. No que diz respeito à interação dos fatores, a mesma também foi estatisticamente significativa pois explicitou valor de p inferior a 5%. O coeficiente de correlação (R^2) obtido para o ajuste do modelo matemático proposto aos dados experimentais indicou uma explicação dos dados de 78,76%.

Ainda na Tabela 4, pode-se verificar que o valor do coeficiente linear para a variável temperatura foi positivo, o que sugere que a melhor eficiência do processo para os compostos fenólicos tem tendência a ser alcançada com a temperatura de extração superior ao ponto central, definido pelo planejamento experimental, de 50,0 °C.

Na Figura 4, é encontrada a distribuição dos resíduos da concentração de compostos fenólicos em triplicata (valores previstos pelo modelo em função dos valores observados) e é

demonstrado que alguns valores calculados, em média, estão próximos da reta e outros apresentam relativa dispersão. Por meio da análise da Figura 4, pode-se afirmar que houve pouca dispersão dos valores observados em relação a reta de valores preditos, confirmando assim o bom ajuste do modelo para a concentração de compostos fenólicos, não tendo a ocorrência de um comportamento tendencioso.

Figura 4 – Distribuição dos resíduos: valores preditos pelo modelo em função dos valores observados no experimento do delineamento experimental da extração aquosa do arilo carnoso autoclavado do maracujá para a concentração de compostos fenólicos



Fonte: Autoria própria (2021)

Os modelos de correlação entre os parâmetros significativos e as variáveis experimentais, temperatura e tempo de extração, foram corroborados de acordo com a análise de variância (ANOVA), sendo os resultados encontrados na Tabela 5. De acordo com Neto, Scarmino e Bruns (1996), o modelo é tido como válido se o fator resultante da análise de ANOVA ($F_{\text{calculado}}$) for maior que o fator F_{tabelado} (Tabela F de Fisher, com 95% de confiança). Analisando os resultados obtidos na tabela 5, percebe-se que o modelo em estudo é válido, visto que o $F_{\text{calculado}}$ foi de 25,95, sendo este maior que o F_{tabelado} que foi de 2,71.

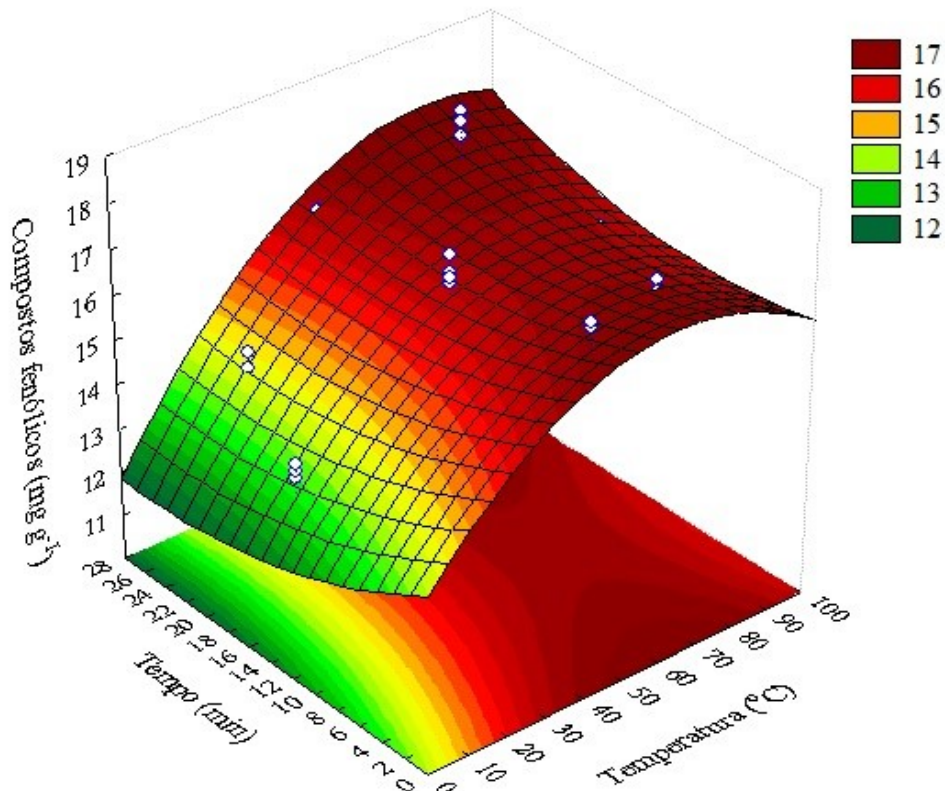
Tabela 5 – ANOVA do modelo de concentrações de compostos fenólicos obtidos pelo delineamento experimental da extração sólido-líquido do arilo carnoso autoclavado do maracujá

Fatores	Graus de liberdade	Soma de Quadrados (SQ)	Média dos Quadrados (MQ)	F _{calculado}	F _{tabelado (95% de confiança)}	p
Regressão	4	41,2	10,3	25,95	2,71	< 0,05
Resíduos	28	11,1	0,4			
Total	32	52,4	1,6			

Fonte: Autoria própria (2021)

Na análise da superfície de resposta, foi avaliada a concentração de compostos fenólicos como variável resposta, ocorrendo a construção da curva a partir dos resultados encontrados com o delineamento experimental, sugerindo as condições de operação do sistema que maximizam a concentração (Figura 5). Os dados experimentais mostraram-se previstos aplicando um modelo de segunda ordem para o valor da concentração de compostos fenólicos, indicando sua dependência com os valores das variáveis independentes temperatura e tempo de extração.

Figura 5 – Superfície resposta para a concentração de compostos fenólicos em função da temperatura e tempo de extração



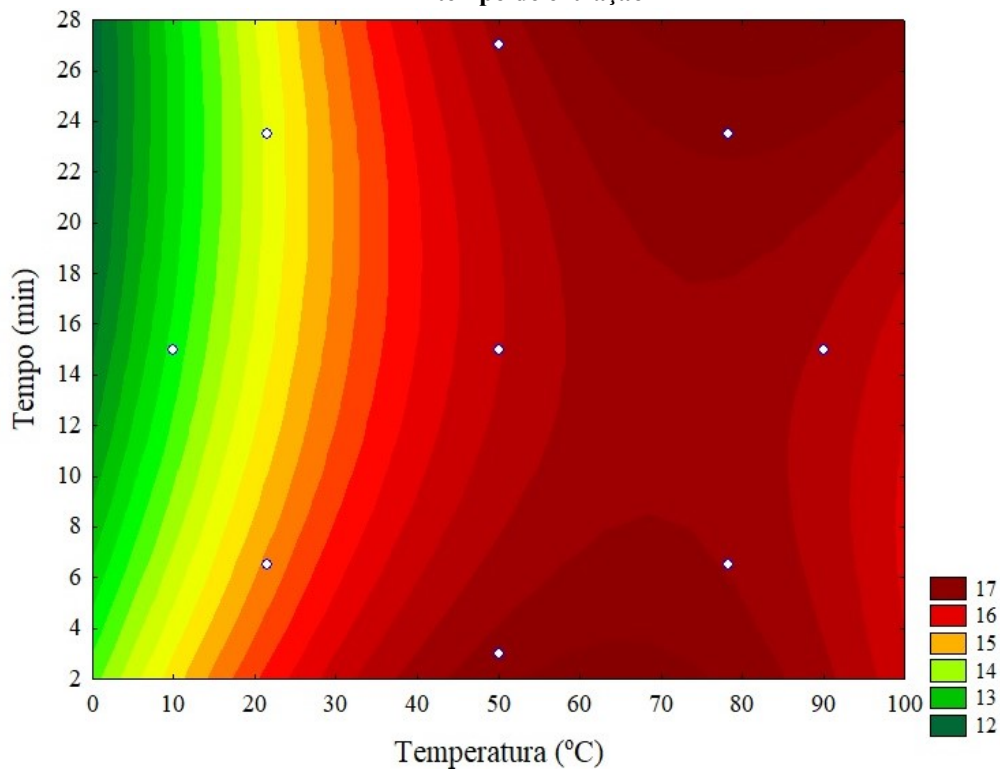
Fonte: Autoria própria (2021)

Constata-se que ocorreu aumento na concentração de compostos fenólicos para temperaturas de extração mais elevadas (acima de 50,0 °C) (Figura 5). Na Figura 5, mostra-se também o comportamento da concentração de compostos fenólicos em função do tempo de extração, evidenciando que a variação do tempo de extração, dentro da faixa avaliada, não representa significativa alteração da concentração de compostos fenólicos, estando em todos os casos em níveis elevados destes compostos.

Os resultados são apresentados ainda em relação ao perfil de resposta (Figura 6), onde a análise das variáveis operacionais é realizada em duas dimensões, também chamado de gráfico de contorno com as curvas de níveis.

De maneira geral, pela análise feita na superfície e perfil de resposta pode-se concluir que em temperaturas na faixa de 60,0 a 75,0 °C e nos menores e maiores tempos de extração, observam-se as maiores concentrações de compostos fenólicos.

Figura 6 – Perfil de resposta para a concentração de compostos fenólicos em função da temperatura e tempo de extração



Dessa forma, o ponto ótimo da curva foi na temperatura de 90,0 °C e no tempo de 27,0 min. No entanto, foram utilizados os valores de 78,4 °C e 23,5 min para temperatura e tempo de extração, respectivamente, pois estes apresentaram os valores de máxima extração de compostos fenólicos indicados nos ensaios delineados do planejamento para garantir que o

tempo de extração fosse adequado, visto que este não indicou influência expressiva na eficiência da extração aquosa do arilo autoclavado do maracujá.

4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá apresentou valor de 49,20% de atividade de sequestro do radical livre DPPH. Cazarin et al. (2014) obteve valor de 46,35% de atividade antioxidante da farinha da casca do maracujá em extrato aquoso, 32,5% em extrato metanólico e 29,6% em extrato etanólico. Ainda, a extração aquosa, comparada à extração metanólica e etanólica, é mais eficiente para remoção dos compostos fenólicos da farinha obtida da casca do maracujá, ou seja, compostos que possuem atividade antioxidante, incluindo a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados e os flavonoides (CAZARIN et al., 2014).

Além disso, os resultados são importantes porque confirmam a presença de compostos antioxidantes no arilo do maracujá, resultados inéditos para a literatura.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Com relação aos resultados físico-químicos do extrato do arilo carnoso autoclavado do maracujá (Tabela 6), nota-se pelo valor do pH seu caráter ácido (3,97). López-Vargas et al. (2013) mostraram índices de pH semelhantes aos do presente estudo para extratos das sementes e da fibra da polpa do maracujá (pH 4,36) e para a fibra de albedo de maracujá (pH 3,75). Freire et al. (2015) também obtiveram pH no valor de 3,84 para o extrato de albedo do maracujá, 4,09 para o extrato de flavedo e 3,89 para o extrato da casca integral (albedo e flavedo).

Tabela 6 – Dados físico-químicos médios e desvio-padrão do extrato do arilo carnoso (endocarpo) do maracujá

Parâmetro		
pH	Acidez total (%)	Sólidos Solúveis (°Brix)
3,97 ± 0,05	10,54 ± 0,62	3,50 ± 0,67

Fonte: Autoria própria (2021)

Na análise de acidez total, o extrato do endocarpo autoclavado apresentou valor de 10,54% em ácido cítrico. Nachbar (2013) obteve 3,74 g de ácido cítrico em 100 g de amostra

da polpa do maracujá amarelo, resultados que podem ser explicados pelo nível de maturação da fruta ou a parte do maracujá analisado. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo caracterizando ou avaliando o extrato do arilo do maracujá.

Com relação aos sólidos solúveis, pode-se observar baixos índices (3,50 °Brix), explicados, por exemplo, devido a baixas temperaturas ou pouca luminosidade no desenvolvimento dos frutos, o que leva a diminuição no nível de fotossíntese e consequente menor acúmulo de açúcares nos frutos. Outro fator que pode explicar baixos valores de sólidos solúveis é o estado de maturação do fruto, quanto menos maduro o fruto, menor o teor de sólidos solúveis. Coelho et al. (2017) encontraram 28,0 °Brix e 27,8 °Brix em relação a farinha da casca do maracujá sem e com tratamento, respectivamente, o que indica possível maior maturação da fruta.

A porcentagem de umidade encontrada no arilo autoclavado foi de 8,41%, sendo este resultado com pequena diferença do valor relatado por Canteri et al. (2010) (6,0%), que também avaliou a umidade do arilo não autoclavado do maracujá.

4.4 RENDIMENTO

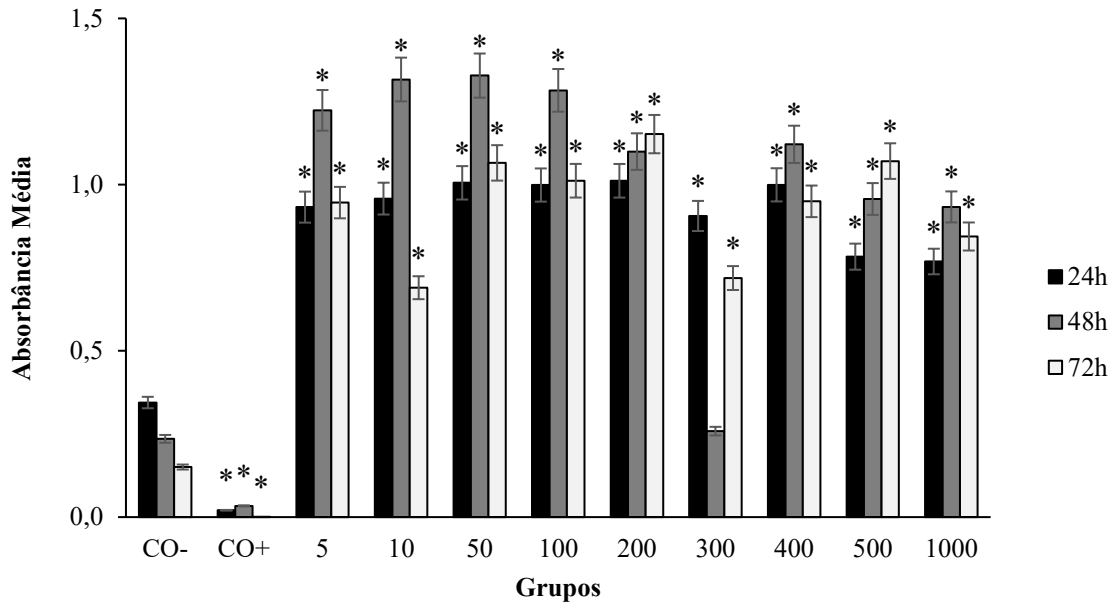
O rendimento máximo do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá, após liofilização, foi de 39,60%. Esse valor considerável de rendimento pode ser explicado pelo fato do endocarpo autoclavado ter baixo teor de umidade (8,41%), como indicado anteriormente, e também pode ser devido a presença de compostos fotossensíveis nos extratos produzidos no presente estudo, não degradados pela alta temperatura de extração e baixa temperatura de liofilização. Pita (2012) encontrou rendimento de 17,14% da farinha da casca do maracujá, menor comparado ao do presente estudo, provavelmente por ter sido utilizado o solvente alcoólico éter etílico, além do material avaliado em questão ser diferente ao do presente estudo.

4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os dados da Figura 7 apresentam os valores médios de absorbância e desvios-padrões obtidos com as células de carcinoma hepatocelular HuH7.5 tratadas com as diferentes

concentrações do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Figura 7 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado humano HuH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $3,0 \times 10^4$ células por poço.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2021)

Os dados mostram que todas as concentrações (exceto a concentração de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo de 48 horas) do extrato do arilo autoclavado do maracujá apresentaram absorbâncias médias maiores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica estímulo da divisão celular destas concentrações avaliadas nos três tempos. Vale destacar que as viabilidades celulares (Tabela 7) destas concentrações foram maiores que 223% (24 horas), 396% (48 horas) e 458% (72 horas). Inclusive, pode-se observar um aumento da viabilidade celular com o passar do tempo para quase todas as concentrações avaliadas.

Tabela 7 - Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado humano HuH7.5, tratadas com o extrato aquoso do arilo carnosu autoclavado do maracujá por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100	100	100
CO+	5,9779	14,3585	0,2656
5 µg mL ⁻¹	270,5746	519,7111	628,1541
10 µg mL ⁻¹	278,0035	559,1334	458,1673
50 µg mL ⁻¹	291,7586	564,1461	707,4369
100 µg mL ⁻¹	289,8433	545,2846	671,8459
200 µg mL ⁻¹	293,5577	467,0348	764,9402
300 µg mL ⁻¹	262,8555	109,8556	477,4236
400 µg mL ⁻¹	290,0174	476,2957	630,6773
500 µg mL ⁻¹	227,3360	406,4571	711,0226
1000 µg mL ⁻¹	223,0992	396,3466	560,4250

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Fonte: Aatoria própria (2021)

A indução da divisão celular ou da atividade mitocondrial das células HuH7.5 tratadas com o extrato do arilo autoclavado do maracujá pode ser explicada pela grande quantidade de nutrientes contidos no maracujá e o grande potencial antioxidante. Os estudos de Rizzon; Meneguzzo (2007) e Rizzon; Miele (2012) mostraram que a estimulação das divisões celulares das células tratadas com extratos frutuosos está relacionada à presença de compostos bioativos presentes nos frutos, como vitaminas, compostos fenólicos, antioxidantes, dentre outros. Além disso, as divisões celulares em células tumorais podem ser explicadas pelo fato destas serem proliferativas, contendo todas as vias apoptóticas mutadas, tornando-se assim resistentes à morte e auto eliminação (SERAFIM, 2018). Em especial, esta rara linhagem tumoral (HuH7.5) é um tipo de célula metabolizadora, que pode ter metabolizado ou degradado os compostos com atividade citotóxica/antitumoral do extrato avaliado. Por isso, outras linhagens tumorais e normais devem ser avaliadas, buscando identificar melhor atividade biológica do extrato aquoso do arilo carnosu autoclavado do maracujá produzido.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou bons resultados para a extração de compostos do arilo carnoso (endocarpo) autoclavado da *Passiflora edulis f. flavicarpa* na temperatura de 78,4 °C e no tempo de 23,5 min, atingindo 39,60% de rendimento de extração. Esse resultado é satisfatório, visto que a umidade do endocarpo corresponde 8,41% de seu peso.

A avaliação físico-química identificou a acidez do arilo tanto pelo pH como pela acidez molar total. Além disso, o baixo índice de sólidos solúveis pode ser explicado pelo grau de maturação da fruta. Também, foi confirmada a atividade antioxidante do endocarpo do maracujá, utilizando a redução do radical livre DPPH.

Nos ensaios com células HuH7.5 humanas, praticamente todas as concentrações do extrato do endocarpo autoclavado do maracujá apresentaram absorbâncias médias maiores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica estímulo da divisão celular destas concentrações avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Assim, os dados do presente trabalho indicam que outras linhagens tumorais e normais devem ser avaliadas, buscando identificar melhor atividade biológica do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá produzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATINI, R.; DE ALMEIDA, R. B.; FAUSTINO, T. T. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, out. 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARANTES, V. P.; LOPES, M. W.; TIYO, R. Utilização de passiflora *incarnata* no tratamento da ansiedade. **Revista UNINGÁ**, v. 29, n. 2, p. 81-86, jan. 2017.
- BARBALHO, S. M. et al. Yellow passion fruit rind (*Passiflora edulis*): an industrial waste or an adjuvant in the maintenance of glycemia and prevention of dislipidemia. **Journal of Diabetes Research & Clinical Metabolism**, article in press, 2012. Disponível em: <<http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-0866-1-5.pdf>>. Acesso em: 15 de junho de 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 22, p. 25-30. 1995.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- CANTERI, M. H.; SCHEER, A.; PETKOWICZ, C.; GINIES, C.; RENARD, C.; WOSIACKI, G. Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 49, n. 3, p. 113-122, jul. 2010.
- CARDOZO, T. R. et al. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 603, n.1, p. 83–96, jan. 2006.
- CASSILETH, B. R.; DENG, G. Complementary and alternative therapies for cancer. **The Oncologist**, v. 9, n. 1, p. 80-89, 2004.
- CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K.; COLOMEU, T. C.; ZOLLNER, R. L.; JUNIOR, M. R. M. Capacidade antioxidante e composição química da casca do maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1699-1704, set. 2014.
- COELHO, E. M. et al. Physico-chemical properties, rheology and degree of esterification of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 166-173, maio 2017.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, ago. 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, jan. 1997.

DA CONCEIÇÃO, A. O.; JOSÉ, A. R. S.; PIRES, M. M. Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade. **Revista Maracujá no Brasil**, p. 1-237, 2011.

DA SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity os aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882-890, out. 2013.

DECAT, C. S.; ARAUJO, T. C. C. F. Psico-oncologia: apontamentos sobre a evolução histórica de um campo interdisciplinar. **Brasília Médica**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 93-99, abr. 2010.

DE ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais. **Scielo Ebook**, v. 3, p. 1-221, 2011.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, jan. 2005.

DE MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; DE AMORIN, E. L. C.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: na ethnobotanical approach. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 11, p. 1-14, mar. 2011.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, out. 2016.

FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Cartilha de Classificação do Maracujá**. Comissão Técnica de Agricultura. Disponível em: <<http://www.faep.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/frutas/maracuja.htm>>. Acesso em: 13 de junho de 2020.

FEITOSA, R. C. L.; PONTES, E. R. J. C. Levantamento dos hábitos da vida e fatores associados à ocorrência de câncer de tabagistas do município de Sidrolândia (MS, Brasil). **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, p. 605-613, jan. 2011.

FERREIRA, C. P. S. **Extração em meio aquoso e concentração por processos de membranas de fibras solúveis a partir do bagaço de uva branca**. 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Técnico Lisboa. Rio de Janeiro. 2013.

FILHO, G. A. F.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Maracujá**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>>. Acesso em: 20 de junho de 2020.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 90-95, dez. 2011.

- FREIRE, L. S.; FREITAS, A. K. N.; PAZ, H. C.; SILVA, M. J. M.; PIRES, R. M. C. Determinação de pH e atividade de água em farinha de casca de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **5º Simpósio de Segurança Alimentar. Alimentação e Saúde**, p. 1-5, maio 2015.
- GARCIA, L. P. **Liofilização aplicada a alimentos**. 2009. 45 p. Trabalho Acadêmico (Graduação Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2009.
- GAD, S. C. Primary hepatocyte culture as an *in vitro* toxicologic system for the liver. S. C. Gad (2 Ed.), *In vitro toxicology*, **Taylor & Francis**, New York, p. 273-302, 2000.
- GEORGE, D. R.; EDRIS, W.; HANDSON, R.; GILMAN, F. Medicinal plants – next generation. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 16-22, jan. 2016.
- GLOBOCAN. **UICC: global cancer control**. New Global Cancer Data: Globocan, 2018. Disponível em: <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>. Acesso em: 7 maio 2021.
- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 825-827, out. 2005.
- GUINDANI, M. et al. Estudo do processo de extração de compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus sabdariffa*. **COBEQ 2014 – XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1-7, out. 2014.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p. 1-93, fev. 2006.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 5. ed. rev., atual. e ampl. – Rio de Janeiro: Inca, 2019.
- JANEIRO, D. I.; QUEIROZ, M. S. R.; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; CUNHA, M. A. L.; DINIZ, M. F. F. M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 18, p. 724-732, dez. 2008.
- LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 781-786, abr. 2007.
- LÓPEZ-VARGAS, J. H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756-763, maio 2013.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora edulis f. flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 127-134, jan. 2012.

MALTA, D. C.; ANDRADE, S. S. C. A.; OLIVEIRA, T. P.; DE MOURA, L.; DO PRADO, R. R.; DE SOUZA, M. F. M. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, p. 1-13, abr. 2019.

MARENDA, F. R. B. **Citotoxicidade de pectinas do albedo de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) em linhagens tumorais**. 2015. 69 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.

MAXWELL, E. G.; BELSHAW, N. J.; WALDRON, K. W. MORRIS, V. J. Pectin- an emerging new bioactive food polysaccharide. **Journal Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p. 64-73, abr. 2012.

MAZZEO, D. E. C. 2009. 114 p. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, 2009.

MELECCHI, S. I. M. 2005. 197 p. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2005.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 83-91, out. 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.

MOTA, N. S. R. S. et al. F. *In vivo* antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg. Rich in médium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 557-565, ago. 2018.

NACHBAR, F. R. F. **Compostos bioativos presentes em cultivares de maracujá**. 2013. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 2013.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 393-397, mar. 2003.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. 1996. 299 p. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55-62, maio 2016.

OLIVEIRA, G. A. R. Otimização de processos de extração de princípios ativos de plantas. **Revista Processos Químicos**, v. 8, n. 16, p. 33-41, jul. 2014.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. do N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259-262, set. 2002.

OLIVEIRA, R. J.; RIBEIRO, L. R.; DA SILVA, A. F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1225-1233, out. 2006.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Ponta Grossa, Paraná, v. 10, n. 2, p. 106-110, abr. 2005.

PITA, J. S.L. 2012. 77 p. **Caracterização físico-química e nutricional da polpa e farinha da casca de maracujazeiros do mato e amarelo**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

PONTES, E. D. S. et al. Diferentes Métodos de Extração de Compostos Bioativos de Vegetais. **International Journal of Nutrology**, v. 11 (S 01), p. S24-S327, set. 2018.

QUINN, R. J.; HARVEY, A. L.; EDRABA-EBEL, R. The re-emergence of natural products for drug Discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, jan. 2015.

RIBEIRO., L. H. L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 5, p. 1733-1742, maio 2019.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 45, 2007.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 93-97, fev. 2012.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA A. F. 2009. 358 p. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2 ed. Campinas, SP: Editora AMIC, 2009.

ROGERO, S. O.; SAIKI, M.; CRUZ, A. S.; SANTOS, R. P.; ROGERO, J. R.; COSTA, I. **Estudo da citotoxicidade de elementos de ligas metálicas utilizadas como biomateriais**. 17º CBECIMat – Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, 12 p., 2006.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 3, n. 3, p. 317-320, abr. 2003.

SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacology as a tool for the selection of medicinal plants for screening antitumour activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 2, n. 1, pp. 7–17, jan. 1999.

SAWADA, M. M. 2012. 129 p. **Estudo da viabilidade técnica da substituição de Hexano por Etanol no processo de extração de óleo de Soja: cinética de extração e índices de qualidade**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. 2012.

SERAFIM, T. S. Por que é que as células cancerosas conquistam território às saudáveis?. **Revista Público**, v. 7. Edição 26. 2018. Disponível em: <https://www.publico.pt/2018/12/14/ciencia/noticia/celulas-cancerosas-conquistam-territorio-saudaveis1854627#:~:text=Quando%20as%20c%C3%A9lulas%20saud%C3%A1veis%20s%C3%A3o,c%C3%A9lulas%20tumorais%20conquistam%20assim%20territ%C3%B3rio>. Acesso em: 3 de maio de 2021.

SERGUNCHENKO, I.; KOLENCHENKO, E.; KHOTIMCHENKO, M. Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. **Nutricional Research**, v. 27, p. 633-637, out. 2007.

SILVA, C. B. 2008. 81 p. **Avaliação da atividade antitumoral em extrato de *Inigofera suffruticosa* Mill.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). UFPE. Recife. 2008.

SILVA, D. C. et al. Polyssacharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Journal Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 139-145, jan. 2012.

SIM, H.; KNOX, J. Hepatocellular carcinoma in the era of immunotherapy. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 1, p. 40-48, jan. 2018.

SIMONETTI, A. C. 2004. 64 p. **Atividade Antitumoral e Toxicidade de Nanopartículas contendo o Ácido Fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (Líquén)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife. 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Journal Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Dinglers Polytechnisches Journal**, v. 232, p. 461-465. 1879.

TUOPING, L.; SUHONG, L.; YINPING, D.; RUGANG, Z.; YONGHUI, L. Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglycerides synthesis in mice fed with a high-fat-diet. **Food Chemistry**, v. 145, p. 335-341, fev. 2014.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, p. 237-245, mar. 2011.

VEGGI, P. C. 2009. 165 p. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual De Campinas – UNICAMP. Campinas, 2009.

WONGKITTIPONG, R.; PRAT, L.; DAMRONGLERD, S.; GOURDON, C. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants – experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v. 40, n. 2, p. 147-154, dez. 2004.

ZARDETO-SABEC, G.; DE JESUS, R. A.; QUEMEL, F. S.; ZENAIDE, F. S. Plantas medicinais como alternativa no tratamento de câncer. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 27, n. 3, p. 75-80, jun. 2019.

ZHANG, L. et al. Anti-tumor effect of LATS2 on liver cancer death: Role of DRP1-mediated mitochondrial division and the Wnt/ β -catenin pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 1-12, jun. 2019.

ZERAK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J, H. Maracujá: um alimento funcional?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, jun. 2010.