

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

GUILHERME HENRIQUE BERTON

**PRODUÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.
E SUA AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *IN VITRO***

**FRANCISCO BELTRÃO
2023**

GUILHERME HENRIQUE BERTON

**PRODUÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.
E SUA AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *IN VITRO***

**Production of the aqueous extract of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.
and its in vitro cytotoxic study**

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

Orientadora: Elisângela Düsman

Coorientadora: Iredé Angela Lucini Dalmolin

Coorientadora: Tânia Maria Cassol

FRANCISCO BELTRÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

GUILHERME HENRIQUE BERTON

**PRODUÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.
E SUA AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *IN VITRO***

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

Data de aprovação: 27/Junho/2023

Elisângela Düsman
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Irede Angela Lucini Dalmolin
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Tânia Maria Cassol
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

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

FRANCISCO BELTRÃO

2023

Dedico este trabalho a quem colaborou diretamente
comigo e viu um potencial em mim que alguns
momentos eu mesmo não via: minhas orientadoras
Dr^a. Elisângela Düsman, Dr^a. Irede Angela Lucini
Dalmolin e Dr^a. Tânia Maria Cassol, sem as quais eu
não teria concluído este projeto.

AGRADECIMENTOS

Certamente esses parágrafos não alcançarão todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Portanto, antecipadamente peço desculpas àqueles que não são mencionados aqui, mas eles podem ter certeza de que estão em meus pensamentos e sou grato a eles.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família em especial aos meus avós Angelo Severo Biazus e Iracema Mazzeto Biazus por não ter permitido que a chama da esperança se apagasse em meu interior.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Elisângela Düsman, pela sabedoria, persistência e força com que me guiou por este caminho tão importante.

As minhas coorientadoras Prof^a. Dr^a. Irede Angela Lucini Dalmolin e a Prof^a. Dr^a. Tânia Maria Cassol que sempre se fizeram presentes e não mediram esforços para me auxiliar em momentos difíceis.

Aos Técnicos Laboratoriais Camila da Rosa Vanin, João Paulo Fernando Mileski, Magali Aparecida Schllemer, Raquel Ludwichk Orben, Ronaldo Follmann Santos, Sinara Queli Welter Nardi e a estagiária Bianca Adelina Bispo da Coordenação de Estação Experimental (COEXP) que me ajudaram sempre que recorri a eles.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia e Ecotoxicologia (BIOECO) que sempre me auxiliaram em tudo.

O presente trabalho recebeu recursos financeiros proveniente do Edital 07/2022 – DIRGRAD/DIRGE da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – FB – Apoio à execução de trabalhos de conclusão de curso.

Um cientista em seu laboratório não é apenas um
técnico: ele também é uma criança diante de
fenômenos naturais que o impressionam como
um conto de fadas.
Marie Curie.

RESUMO

De acordo com a medicina popular, a *Urera baccifera* é uma planta com uma vasta propriedade medicinal. A extração de compostos para a produção de fitoterápicos é de suma importância e, as novas tecnologias na área de extração têm auxiliado na obtenção de compostos desejados e com propriedades adequadas para o auxílio no tratamento de certas enfermidades. Um método para análise e desenvolvimento de novos medicamentos é através da avaliação da citotoxicidade destes *in vitro*, com linhagens celulares normais e tumorais. Assim, o objetivo do presente estudo foi produzir um extrato aquoso de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. e avaliar sua citotoxicidade frente células tumorais de fígado humano (HUH7.5), fígado de *Rattus norvegicus* (HTC) e normal de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2), pelo teste do MTT. A extração aquosa da *U. baccifera* foi realizada através de extração sólido-líquido via Soxhlet, com os solventes etanol, hexano e água por 8 horas, e por maceração com agitação constante com o solvente água em temperatura ambiente durante 30 minutos. O extrato aquoso produzido por maceração apresentou uma EC₅₀ média igual a 149,18 g_{extrato}/g_{DPPH} para atividade antioxidante. Quando testado em linhagens tumorais, apresentou efeito citotóxico para as células tumorais HUH7.5 em 24 horas na concentração de 1000 µg/mL e, em 72 horas nas concentrações de 300, 400 e 500 µg/mL. Para as células HTC mostrou efeito citotóxico nas concentrações 200, 400, 500 e 1000 µg/mL no tempo de 48 e 72 horas. Para as células normais LLC-MK2 a citotoxicidade ocorreu apenas no tempo de 48 horas para as concentrações de 400, 500 e 1000 µg/mL. Assim, o extrato apresentou efeito promissor, pois além de ter atividade antioxidante, manteve o efeito citotóxico com o passar do tempo de tratamento apenas para as linhagens tumorais.

Palavras-chave: *U. baccifera*; citotoxicidade; MTT; extração aquosa.

ABSTRACT

According to popular medicine, *Urera baccifera* is a plant with a vast medicinal property. The extraction of compounds to produce phytotherapeutics is of utmost importance, and new technologies in extraction have helped in obtaining desired compounds with properties suitable to help in the treatment of certain diseases. One method for the analysis and development of new drugs is through the evaluation of their cytotoxicity in vitro, with normal and tumor cell lines. Thus, the objective of this study was to produce an aqueous extract of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. and to evaluate its cytotoxicity against human liver (HUH7.5), *Rattus norvegicus* liver (HTC) and normal *Macaca mullata* kidney (LLC-MK2) tumor cells, by the MTT test. The aqueous extraction of *U. baccifera* was performed by solid-liquid extraction via Soxhlet, with the solvents ethanol, hexane and water for 8 hours, and by maceration with constant stirring with the solvent water at room temperature for 30 minutes. The aqueous extract produced by maceration showed an average EC_{50} equal to 149.18 $g_{\text{extract}}/g_{\text{DPPH}}$ for antioxidant activity. When tested on tumor cell lines, it showed cytotoxic effect for HUH7.5 tumor cells in 24 hours at a concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$, and in 72 hours at concentrations of 300, 400 and 500 $\mu\text{g/mL}$. For HTC cells it showed cytotoxic effect at concentrations 200, 400, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ at 48 and 72 hours. For normal LLC-MK2 cells the cytotoxicity occurred only at 48 hours time for the concentrations of 400, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$. Thus, the extract showed a promising effect, because besides having antioxidant activity, it maintained the cytotoxic effect over the treatment time only for the tumor cell lines.

Keywords: *U. baccifera*; cytotoxicity; MTT; aqueous extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem da <i>U. baccifera</i> (L.) Gaudich. ex Wedd.	16
Figura 2 – Extração com água da <i>U.baccifera</i> via Soxhlet.....	19
Figura 3 - Placa de 96 poços contendo células HUH7.5 e o tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>U. baccifera</i>	22
Figura 4 - Placa de 96 poços contendo cristais de formazan	22
Figura 5 – Extração via Soxhlet das folhas da <i>U. baccifera</i> com solventes etanol (A), água (B) e hexano (C).....	24
Figura 6- Extrato etanólico das folhas de <i>U. baccifera</i> à esquerda e extrato etanólico das folhas de <i>U. baccifera</i> exposto a luz UV à direita	25
Figura 7 – Extrato aquoso seco via soxhlet exposto a luz UV	25
Figura 8 – Extrato aquoso via agitação mecânica exposto a luz UV	26
Figura 9 – Extração por maceração com agitação mecânica	26
Gráfico 1 – Curva de extração aquosa da <i>U. baccifera</i>	27
Gráfico 2 – Curva de calibração para análise de DPPH.....	29
Gráfico 3 - Absorbância média e desvio-padrão de células normais LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de <i>U. baccifera</i>	29
Gráfico 4 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais hepáticas humanas HUH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de <i>U. baccifera</i>	31
Gráfico 5 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais HTC tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de <i>U. baccifera</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de viabilidade celular (VC) das células normais LLC-MK2 tratadas as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de <i>U. baccifera</i>	30
Tabela 2 - Percentual de viabilidade celular (VC) de células tumorais HUH7.5 tratadas as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de <i>U. baccifera</i>	31
Tabela 3 - Percentual de viabilidade celular (VC) de células tumorais HTC tratadas com as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de <i>U. baccifera</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EC ₅₀	Índice de concentração para redução de 50% a concentração inicial do radical DPPH
HTC	Células tumorais hepáticas de <i>Rattus norvegicus</i>
HUH7.5	Células tumorais hepáticas humanas
LLC-MK2	Células epiteliais de rim de <i>Macaca mullata</i>
MMS	Metanossulfonato de metila
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
S/F	<i>Solvent/Feed</i>
SUS	Serviço Único de Saúde
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	Fitoterápicos e Plantas Medicinais	15
3.1.1	<i>Urera baccifera</i> (L.) Gaudich. ex Wedd.	15
3.2	Extração vegetal	17
3.3	Câncer	17
3.4	Citotoxicidade.....	18
4	MÉTODOLOGIA	19
4.1	Obtenção e preparo das folhas de <i>U. baccifera</i>	19
4.2	Preparo do extrato de <i>U. baccifera</i>	19
4.3	Atividade antioxidante	20
4.4	Testes de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1	Obtenção do Extrato	24
5.2	Atividade antioxidante do extrato	29
5.3	Testes de Citotoxicidade <i>in vitro</i> com células tumorais e normais ..	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

O uso de diversas plantas para fins medicinais pode complementar o tratamento de enfermidades e proporcionar vários benefícios para a saúde. O avanço da ciência e das tecnologias na área da saúde permitiu que o potencial terapêutico das plantas medicinais fosse reconhecido no Brasil e afora (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021). A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, estabelecida em 2006 no Brasil, juntamente com o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de 2008, visam proporcionar à população brasileira acesso seguro e uso consciente de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2023). Além disso, essas iniciativas buscam promover a sustentabilidade e mostram a grande biodiversidade, o crescimento da cadeia produtiva e o fortalecimento da indústria nacional (SOUZA; GASPAROTI; PAULA, 2022).

A *Urera baccifera* L. Gaudich ex Wedd, uma planta da família *Urticaceae*, ainda não está incluída na lista de plantas medicinais da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Serviço Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2022). É uma planta nativa do Brasil que é conhecida popularmente como urtigão, urtiga-braba, urtiga-bronca entre outros nomes. Ela pode ser encontrada em vários países da América Latina, desde o México até a Argentina, incluindo Peru e Bolívia. De acordo com o conhecimento e a medicina popular, a planta possui propriedades adstringentes, anti-inflamatórias, antirreumáticas, antidiabéticas, entre outras (GRINDI; SOUZA; ATHAYDE, 2013).

Na busca de desenvolvimento dos medicamentos fitoterápicos, é crucial selecionar o método de extração adequado para o material vegetal. Com a demanda crescente por compostos biologicamente ativos extraídos de plantas, há um incentivo contínuo para encontrar métodos de extração eficazes e sustentáveis. A extração por Soxhlet é altamente eficiente, mas apresenta algumas desvantagens. Por exemplo, consome muita energia e leva muito tempo para ser concluída. Além disso, não é adequada para materiais com compostos termossensíveis devido ao aquecimento contínuo do extrato no reservatório de solvente (SOUZA; GASPAROTI; PAULA, 2022).

Há um crescente interesse em pesquisar extratos vegetais que apresentam efeitos citotóxicos contra células tumorais, além de não apresentarem esse efeito em

células saudáveis e normais (RODRIGUES *et al.*, 2017). Uma forma para identificação de agentes que possam reduzir o risco de desenvolvimento do câncer é realizando estudos e testes *in vitro*, onde são realizados experimentos com o uso de células tumorais (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Estudos sobre o fitoterápico *U. baccifera* são escassos. Assim, o presente estudo objetivou produzir extrato aquoso da planta *U. baccifera* e avaliar a sua citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens celulares, normais e tumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir extrato aquoso de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. e avaliar sua citotoxicidade *in vitro*

2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato aquoso da planta *U. baccifera* por maceração em temperatura ambiente e via Soxhlet;
- Caracterizar o extrato obtido;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso da *U. baccifera* em células tumorais e normais *in vitro*;
- Comparar os efeitos citotóxicos do extrato para células normais e tumorais.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Fitoterápicos e Plantas Medicinais

A planta medicinal é o vegetal que possui um princípio ativo para o combate, prevenção ou alívio temporário de uma enfermidade. Geralmente o conhecimento sobre como usar, qual parte e qual planta empregar vem da medicina popular, em que na maioria das vezes se restringe ao uso de infusões e emplastros. O fitoterápico é um medicamento que possui a padronização do(s) composto(s) de interesse que a planta medicinal possui, pois, passa pelo processo de industrialização para a criação do medicamento, evitando assim contaminações e substâncias indesejadas e, permitindo a dosagem correta da substância a ser ministrada no organismo (BRASIL, 2023).

Existe uma crescente busca por medicamentos fitoterápicos, tanto nas unidades de saúde do Serviço Único de Saúde (SUS) quanto em navegação pela *internet*. No ano de 2006 foi feita a implantação de uma das primeiras políticas nacionais voltada para fitoterápicos, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, onde 10 anos após a implantação foi realizado um levantamento e descoberto que cerca de 12 mil pessoas por ano são beneficiadas com medicamentos fitoterápicos industrializados, manipulados ou com plantas medicinais frescas (BRASIL, 2023).

O SUS disponibiliza uma lista de medicamentos considerados essenciais para o tratamento de diversas doenças e enfermidades, conhecida como RENAME. Desde 2014, o RENAME continua com as mesmas 12 plantas medicinais e fitoterápicos em suas páginas (MACEDO, 2016). Além da RENAME, o SUS possui a RENISUS, ou Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, onde foi estabelecida em 2009 e inclui 71 espécies vegetais. Seu objetivo é orientar pesquisas e estudos sobre essas espécies (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

3.1.1 *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.

A *Urera baccifera* L. Gaudich. ex Wedd. é uma planta com grande uso na medicina popular e está presente na lista de plantas mais utilizadas pela população do estado do Rio Grande do Sul. Também está incluída na lista de Plantas Medicinais

de Interesse do Sistema Único de Saúde do Rio Grande do Sul (REPLAME/RS) para incentivar mais pesquisas sobre seus compostos e efeitos farmacológicos (RIO GRANDE DO SUL, 2017).

A *U. baccifera* é uma planta da família *Urticaceae* e do gênero *Urera*, que possui 140 espécies. Popularmente conhecida como urtiga brava, urtiga bronca, urtigão, entre outros nomes, é amplamente utilizada para tratamentos adstringente, anti-inflamatório, anti-reumático, depurativo, diurético, antidiabético e vários outros (SCHWIRKOWSKI, 2009).

De origem americana, o Urtigão é encontrado do sul do México até o sul da Argentina, passando pela Costa Rica, Bolívia, Brasil e outros países da América Central e do Sul. Arvoreta que pode alcançar 6 metros de altura (Figura 1), possui espinhos urticantes em seus caules e nas nervuras principais das folhas mais antigas. Suas folhas possuem pelos urticantes e as bordas dentadas com e pecíolo longo (GINDRI, 2016).

Figura 1 - Imagem da *U. baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.



Fonte: Autoria própria (2023)

As análises fitoquímicas da *U. baccifera* mostraram uma alta concentração de substâncias promissoras nas raízes e folhas da planta. Foram encontrados

flavonoides, antioxidantes, polifenóis e outras substâncias com potencial para testes antivirais, antifúngicos, antibacterianos e antitumorais. Isso torna o urtigão uma planta promissora para o desenvolvimento de medicamentos importantes (BENVENUTTI *et al.*, 2019; GINDRI, 2016).

3.2 Extração vegetal

Há vários métodos para extrair compostos de interesse de matérias-primas vegetais. Os métodos tradicionais usados na indústria estão sendo substituídos por novas tecnologias mais sustentáveis e rentáveis (PIRES *et al.*, 2018). Alguns desses métodos, como a maceração, extração com solventes ou percolação e infusão, são considerados padrões para a produção de fármacos, pomadas, cremes e outros produtos regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

Um processo de extração que vem ganhando popularidade devido à sua capacidade de extração e segurança ambiental é a extração supercrítica. Essa tecnologia alternativa é usada para extrair antioxidantes e outros compostos importantes nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia. A extração supercrítica está relacionada à Química Verde, cujo conceito é evitar o uso ou geração de produtos químicos nocivos ao meio ambiente e à humanidade. Com o aumento da preocupação ambiental nos últimos anos, o uso de solventes verdes como água, etanol, além do desenvolvimento de novos materiais para uso em processos químicos têm sido incentivados pelos líderes mundiais (GOMES *et al.*, 2018).

3.3 Câncer

Células normais ou saudáveis são aquelas que crescem e se multiplicam de maneira ordenada para substituir células que não desempenham mais sua função. O câncer é uma doença que faz com que a reprodução de células afetadas por agentes cancerígenos seja desordenada e muito mais rápida do que a das células saudáveis (SANTOS *et al.*, 2023).

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Ele ocorre com maior incidência em países desenvolvidos e tem uma mortalidade anual

de mais de seis milhões de pessoas, representando 12% da mortalidade mundial. No Brasil, dados recentes do Instituto Nacional de Câncer mostram que mais de 626 mil brasileiros foram diagnosticados com câncer em 2020, sendo as mulheres as mais afetadas com mais de 316 mil diagnósticos (SANTOS *et al.*, 2023; SUNG *et al.*, 2021).

A maioria dos atuais tratamentos para esta doença causam uma lista tão grande de efeitos colaterais que debilitam o paciente a tal ponto que dificulta a capacidade das mesmas de realizar tarefas simples diárias, interferindo nas relações sociais e econômicas (FREIRE *et al.*, 2018).

3.4 Citotoxicidade

A citotoxicidade é a capacidade de um material de causar alterações metabólicas nas células, geralmente levando à morte celular. O teste de citotoxicidade é usado como uma alternativa aos testes *in vivo* com animais, pois é ecologicamente correto e existem vários modelos e métodos diferentes disponíveis, dentre eles os ensaios *in vitro* (BCRJ, 2023).

Os testes *in vitro* são uma ferramenta importante para obter informações sobre a toxicidade de um produto. Esses testes utilizam cultura de células animais e fornecem informações sobre como o produto pode afetar os seres humanos (CAVALHEIRO *et al.*, 2018).

A citotoxicidade é amplamente utilizada em pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer. Testes *in vitro* são realizados para medir o potencial de morte celular ou inibição do crescimento de células tumorais humanas. Isso ajuda na descoberta de novos materiais para prevenção ou tratamento de tumores (GOMES, 2013).

4 MÉTODOLOGIA

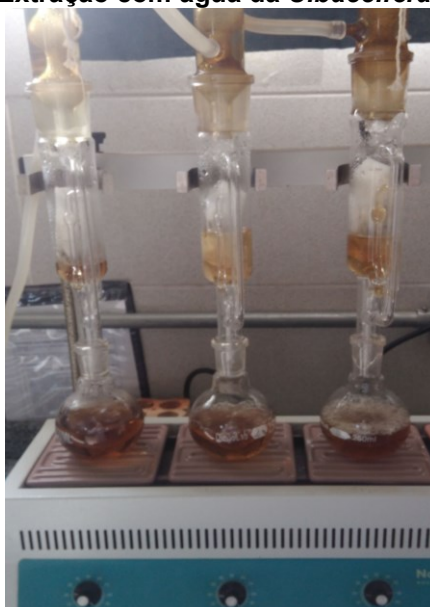
4.1 Obtenção e preparo das folhas de *U. baccifera*

A planta *U. baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. foi obtida nos arredores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *campus* Francisco Beltrão (26° 05' 05,37" S e 53° 05' 27,64" O). A planta foi identificada no laboratório de Biologia da UTFPR-FB. Após, as folhas foram limpas, as nervuras principais removidas e descartadas e as partes restantes das folhas foram cortadas e dispostas em um processador doméstico (marca *Walita*), com lâminas metálicas tipo faca (*cutter*) para particular visando a diminuição de seu tamanho.

4.2 Preparo do extrato de *U. baccifera*

O extrato das folhas da *U. baccifera* foi produzido via Soxhlet e via maceração. Para a extração via Soxhlet seguiu-se a metodologia de Gomes e Nascimento (2019) com modificações. Em um cartucho de celulose foi adicionado 5 g de folhas cortadas e deixadas em sistema de refluxo (Figura 2) com 250 mL de solvente (etanol, água e hexano) por 8 horas. Após a extração o solvente foi separado e recuperado através de rotaevaporação (etanol e hexano) e, no extrato aquoso, foi usado a liofilização para extração da água. Os estudos foram feitos em triplicata.

Figura 2 – Extração com água da *U.baccifera* via Soxhlet



Fonte: Autoria própria (2023)

Para a extração via maceração com agitação mecânica também foi utilizada a água como solvente com a proporção de 10 g de folha para cada litro de solvente (*Solvent/Feed*; S/F = 100), mantendo o processo em temperatura ambiente. Foi realizado o estudo de tempo de extração para a otimização do processo extrativo sólido-líquido variando apenas o tempo e mantendo fixa as outras variáveis como temperatura, solvente e S/F da extração. Assim, a cada dois minutos, pelo período total de 3 horas, foi realizada a coleta de uma amostra e feita a leitura da absorbância no modo varredura onde nas absorbâncias de 266 nm e 268 nm obtiveram maiores números de pontos, de forma a construir a curva de extração. Após obtenção do extrato, ele foi liofilizado e armazenado em temperatura de -8 °C para análises posteriores.

4.3 Atividade antioxidante

A análise de inibição do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi realizada conforme a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2007), para determinar a atividade antioxidante total do extrato.

Para a análise, soluções controle de metanol 50% (v/v), acetona 70% (v/v) e DPPH (60 µM) foram preparadas. A curva de calibração foi criada usando soluções variando de 10 µM a 50 µM da solução de DPPH de 60 µM juntamente com e a solução controle de metanol com acetona. Uma curva de 7 pontos foi avaliada por meio de um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 515 nm.

Em ambiente sem iluminação foram preparadas em triplicata a diluição do extrato na concentração de 11,2 g/L e adicionada uma alíquota de 0,1 mL de solução DPPH 60 µM. Após isso, foi efetuada a medição via espectrofotômetro em um comprimento de onda de 515 nm. Posteriormente, os cálculos para determinar o valor da EC₅₀, que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, foram realizados com a equação da reta encontrada na curva de calibração (RUFINO *et al.*, 2007).

A porcentagem de proteção foi calculada acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Proteção} = \left[\frac{(Abs_{Controle} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Controle}} \right] * 100 \quad (1)$$

4.4 Testes de Citotoxicidade *in vitro*

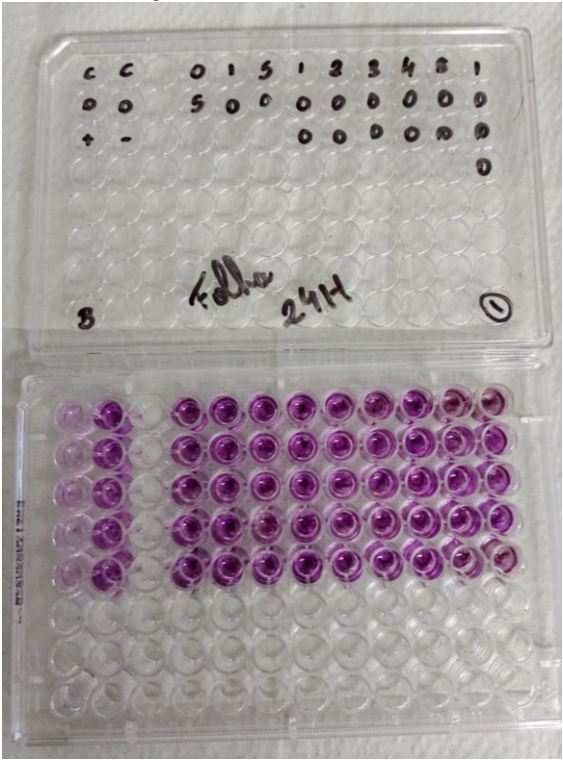
As células epiteliais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2), de tumor de fígado humano (HUH7.5) (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Wander Pavanelli da Universidade Estadual de Londrina) e células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC) (adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa incubadora CO₂ (5%) a 37 °C com 95% de umidade.

Para realizar o teste da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações de Vendruscolo et al. (2022) e Santos et al. (2023).

Utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas 10⁵, 10⁴ e 2x10⁴ células de LLC-MK2, HUH7.5 e HTC, respectivamente, com exceção do poço de controle sem célula (branco). Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionado 100 µL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO-) (meio de cultura), controle positivo (CO+) com o agente citotóxico metanossulfonato de metila (MMS 500 µM) e os tratamentos com diferentes concentrações do extrato. As concentrações foram definidas após testes piloto em 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg/mL (Figura 3). O extrato produzido foi liofilizado antes do preparado das soluções tratamento para o teste de citotoxicidade.

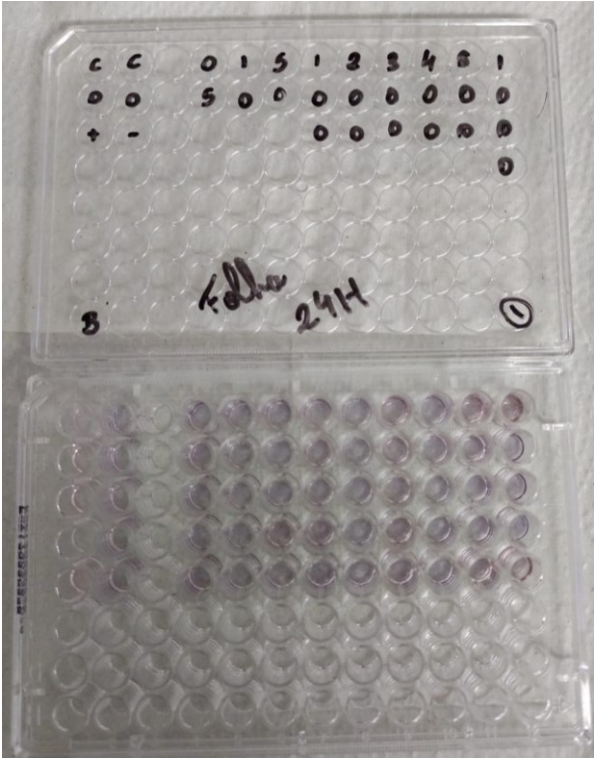
As células, após ficarem incubadas por 24, 48 e 72 horas, tiveram o meio de cultura substituído por 100 µL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg/mL). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas, e na sequência, descartado o meio contendo MTT (Figura 4) e aos poços adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 560 nm.

Figura 3 - Placa de 96 poços contendo células HUH7.5 e o tratamento com diferentes concentrações do extrato de *U. baccífera*



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 4 - Placa de 96 poços contendo cristais de formazan



Fonte: Autoria própria (2023)

Os dados das absorvâncias médias foram verificados por análise de normalidade e variância, pelo programa *Action Stat*. Após isso, foi realizado o teste de comparação de médias de Dunnet de ($\alpha = 0,05$; $n = 8$).

Os valores de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorvância (Abs.) no tratamento e a absorvância do controle negativo (CO-) em porcentagem (Equação 2).

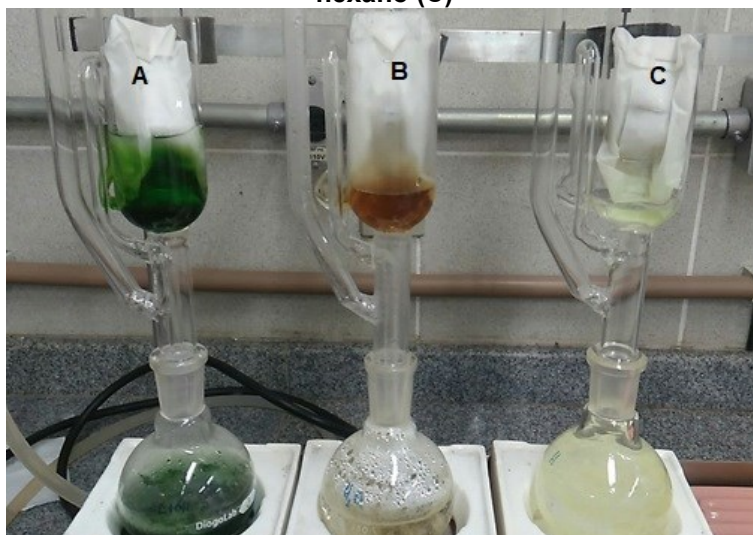
$$VC (\%) = \frac{Abs.Tratamento}{Abs.CO-} * 100 \quad (2)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção do Extrato

A extração via Soxhlet foi realizada com os solventes etanol, água e hexano (Figura 5). Comparando os dados obtidos neste trabalho com aquele do estudo de Benvenuti *et al.* (2019), o extrato etanólico obtido não demonstrou atividades citotóxicas superiores do extrato com diclorometano. Entretanto, foi possível, notar a presença de clorofila no extrato, já que o mesmo quando exposto em luz ultravioleta (UV) tem uma luminescência de cor avermelhada (Figura 6).

Figura 5 – Extração via Soxhlet das folhas da *U. baccifera* com solventes etanol (A), água (B) e hexano (C)

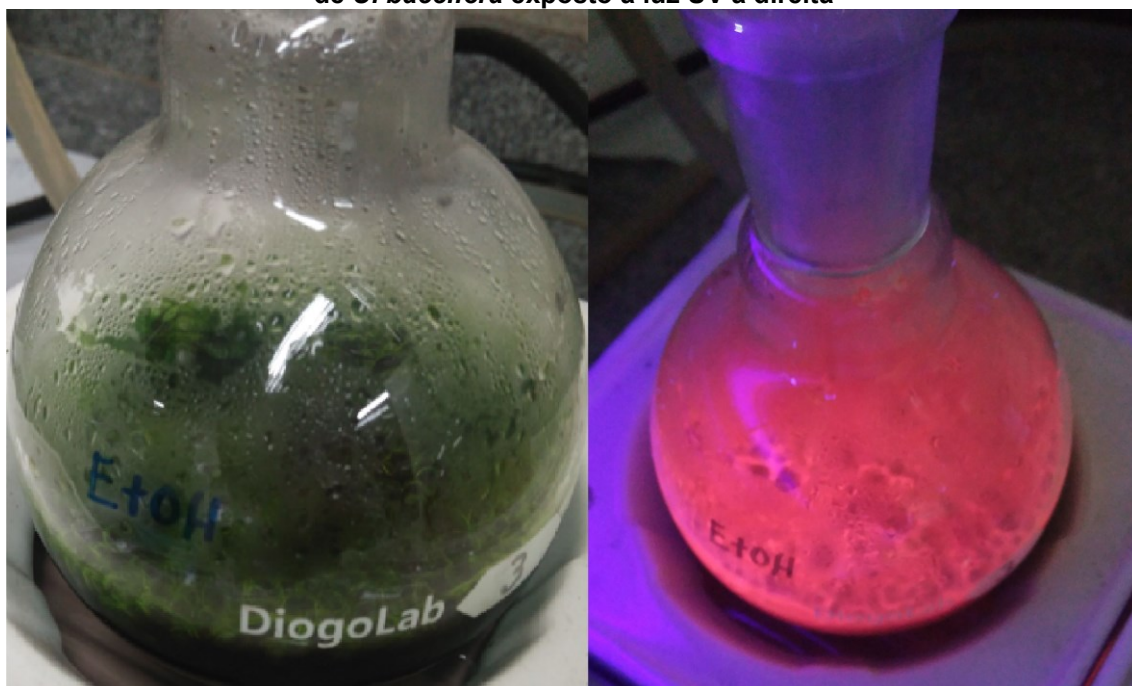


Fonte: Autoria própria (2023)

Quando rotaevaporado, o extrato obtido a partir de hexano não obteve um rendimento suficiente da massa de partida, para realizar qualquer análise. Já o extrato aquoso mostrou a presença de compostos luminescentes (Figura 7). De acordo com Science in School (2023), uma gama de compostos podem emitir luminescência, onde ocorre a absorção de energia fazendo a molécula química ficar em um estado de excitação e quando essa energia é liberada novamente, em formato de fótons de luz, a molécula acaba sendo levada novamente em seu estado fundamental. Compostos cíclicos, duplas ligações, grupos funcionais e a composição estrutural eletrônica da molécula são alguns fatores que influenciam no fenômeno da luminescência (Science in School, 2023).

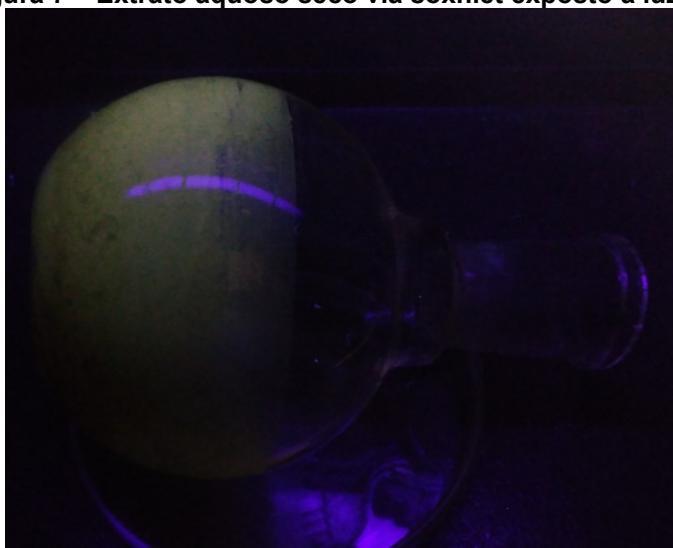
A eficiência da extração via Soxhlet é geralmente alta, porém, ocorrem perdas de compostos termossensíveis, por causa da alta temperatura de extração empregada (temperatura de ebulição). Devido aos outros extratos não apresentarem condições de dar prosseguimento ao trabalho foi escolhido o extrato aquoso para a comparação com outra técnica de extração.

Figura 6- Extrato etanólico das folhas de *U. baccifera* à esquerda e extrato etanólico das folhas de *U. baccifera* exposto a luz UV à direita



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 7 – Extrato aquoso seco via soxhlet exposto a luz UV

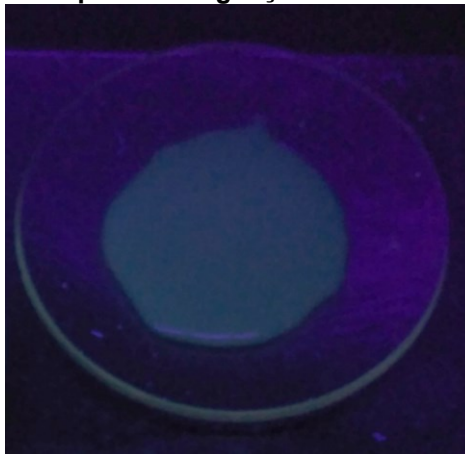


Fonte: Autoria própria (2023)

No extrato aquoso obtido por extração via maceração com agitação mecânica, também foi notada a presença do composto luminescente, como visto na

Figura 8. A maceração ocorreu em temperatura ambiente e não acarreta perdas de compostos termossensíveis como na extração via Soxhlet.

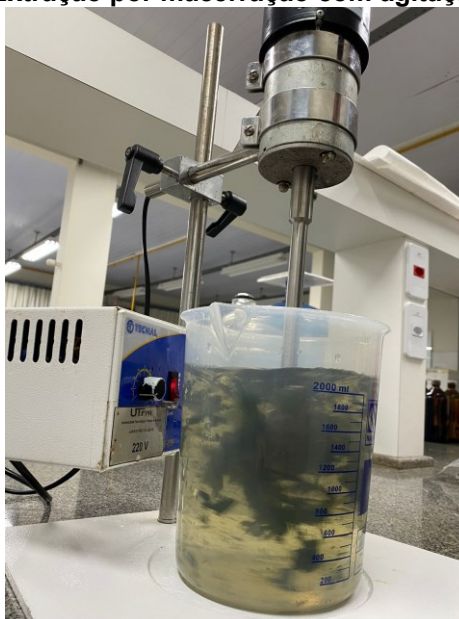
Figura 8 – Extrato aquoso via agitação mecânica exposto a luz UV



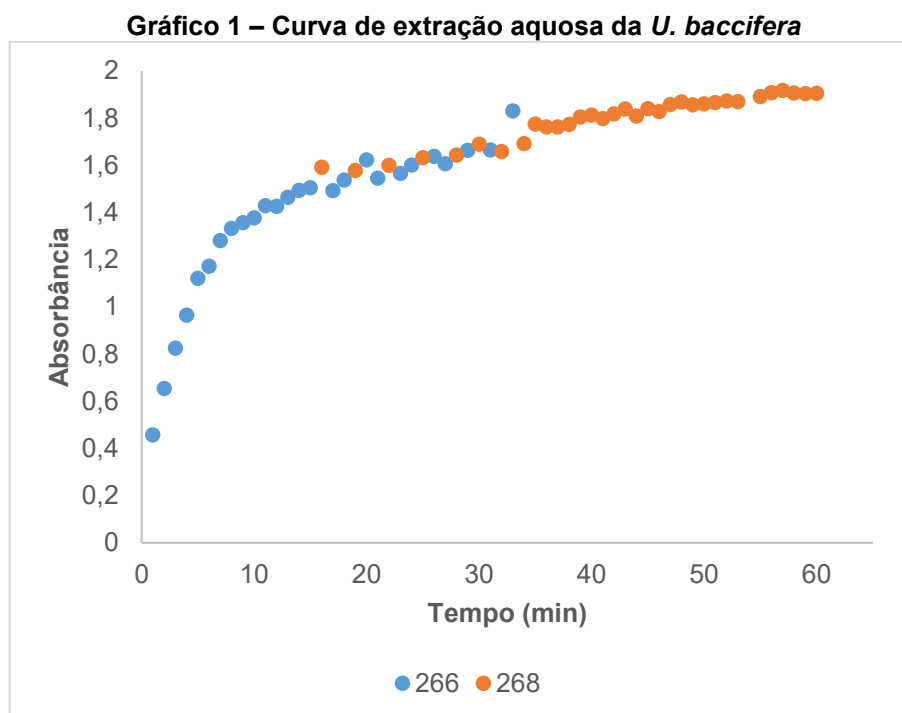
Fonte: Autoria própria (2023)

Para a extração via maceração com agitação mecânica (Figura 9), a curva de extração obtida para a otimização do tempo de extração, avaliada nos comprimentos de onda de 266 nm e 268 nm, encontram-se no Gráfico 1. A curva foi realizada para a determinação do tempo de extração onde não haveria mais gradiente de concentração entre o solvente (água) e a folha do urtigão.

Figura 9 – Extração por maceração com agitação mecânica



Fonte: Autoria própria (2023)



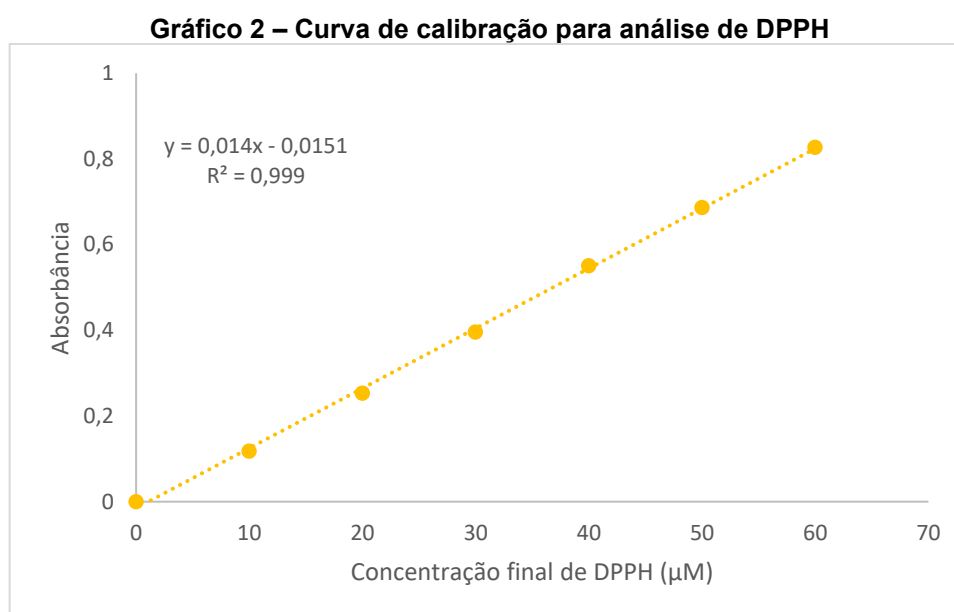
Fonte: Autoria própria (2023)

A extração sólido-líquido pode ser representada tipicamente como uma curva logarítmica quando plotada, onde num primeiro momento tem-se uma taxa constante de extração, seguido pela taxa decrescente de extração e por fim uma extração que é controlada pela difusão. O primeiro momento é onde ocorre uma extração rápida, tendo em vista a abundância de soluto na superfície. Quando o soluto, que se encontra em fácil acesso para o solvente, já não é abundante tem-se o segundo momento em que começa a decrescer a extração. O terceiro momento, quando a extração é controlada pela difusão, não se tem mais soluto de fácil acesso para o solvente extrair e, o gradiente de concentração entre sólido-líquido começa a se aproximar de zero, revelando assim uma região sem extração significativa, ou seja, uma reta constante (ORTIZ, 2015).

No presente estudo, nos primeiros 60 minutos (Gráfico 1) pode-se notar as três regiões citadas, onde do tempo zero até 10 minutos tem-se a taxa constante de extração, já do minuto 12 ao 30 tem-se a taxa decrescente de extração e após 32 minutos não se nota uma variação significativa, sendo assim onde não existe mais gradiente de concentração. Desta forma, foi optado pela utilização do tempo de 30 minutos de extração para a obtenção do extrato final.

5.2 Atividade antioxidante do extrato

Após a construção da curva de calibração para análise do DPPH (Gráfico 2) foi possível obter o valor de EC_{50} do extrato aquoso da *U. baccifera*, valor que indica a quantidade necessária de extrato para inibir 50% do radical livre DPPH. Desta forma, esta análise fornece um valor inversamente proporcional a quantidade de antioxidante presente na amostra, ou seja, quanto menor o valor de EC_{50} maior a quantidade de antioxidante presente na amostra (RUFINO *et al.*, 2007).



Fonte: Autoria própria (2023)

A atividade antioxidante total do extrato aquoso de *U. baccifera* apresentou um EC_{50} médio igual a 149,18 $g_{extrato}/g_{DPPH}$ com desvio padrão de 14,47 $g_{extrato}/g_{DPPH}$. Quando comparado com o trabalho de Santos (2018) que fez a análise de antioxidante de farinha do fruto *Psidium cattleianum*, a quantidade de antioxidantes presente nas folhas da *U. baccifera* é baixa, já que o valor de EC_{50} médio encontrado pelo autor foi próximo de zero. Em contrapartida, levando em consideração o trabalho de Vanin (2015), que utilizou o fruto *Psidium cattleianum* in natura e obteve EC_{50} na casa do milhar, observa-se que o extrato aquoso possui um valor significativo de antioxidantes. Acredita-se que devido ao solvente utilizado, fator que possui uma influência alta para a extração dos antioxidantes, influenciou no resultado da análise. Geralmente solventes orgânicos e com diferença de polaridades têm maior poder de solvatação de compostos antioxidantes. Tal fator influencia a EC_{50} , como mostra o trabalho de Yu *et al.* (2021), em que a extração dos antioxidantes das folhas de oliveira teve uma

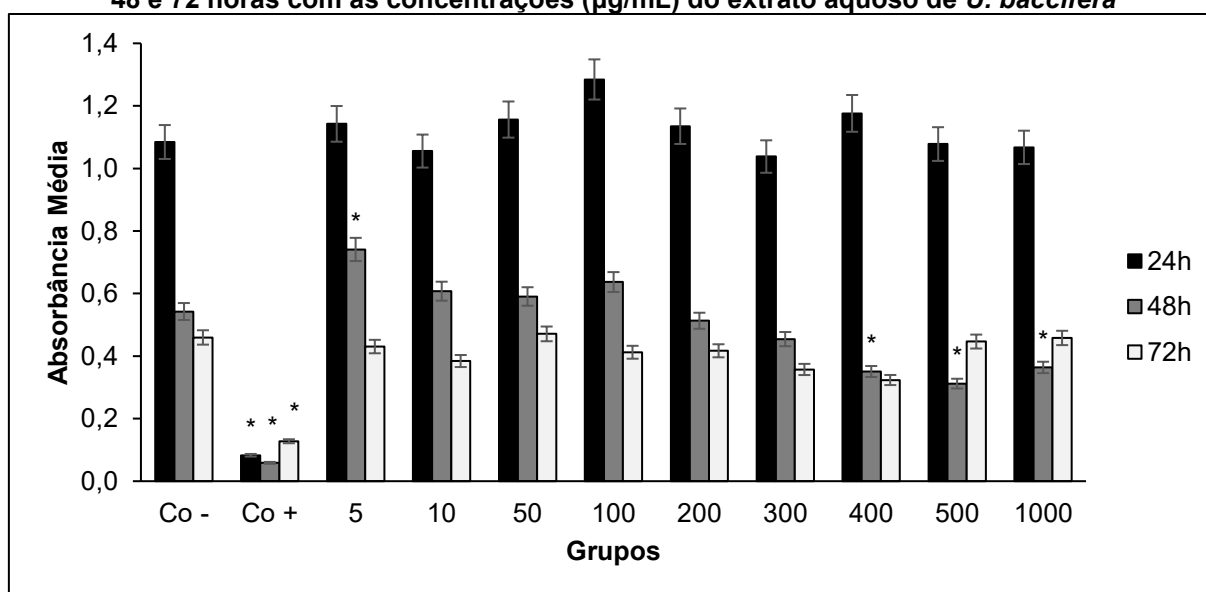
variação de 20,13 a 190,95 µg/mL, dependendo apenas da mudança do solvente utilizado na extração.

5.3 Testes de Citotoxicidade in vitro com células tumorais e normais

Os dados dos Gráficos 4, 5 e 6 apresentam os valores médios das absorbâncias e seus respectivos desvios padrão dos tratamentos das linhagens celulares LLC-MK2, HUH7.5 e HTC, respectivamente, com as diferentes concentrações do extrato de *U. baccifera*.

Para a linhagem LLC-MK2 (Gráfico 3) pode-se observar que no tempo de 48 horas a concentração de 5 µg/mL apresentou resultado estatisticamente diferente do controle negativo, indicando uma proliferação celular desta linhagem celular normal. Entretanto, as concentrações de 400, 500 e 1000 µg/mL apresentaram valores de absorbâncias estatisticamente menores que do controle negativo, apontando efeito citotóxico. Vale destacar que as demais concentrações e tempos de avaliação não apresentaram efeito citotóxico para esta linhagem celular. Tais dados corroboram com os dados da Tabela 1 que mostram as viabilidades celulares das células LLC-MK2 e, somente as concentrações de 400, 500 e 1000 µg/mL do tempo de tratamento de 48 horas apresentaram viabilidades celulares menores que 68%.

Gráfico 3 - Absorbância média e desvio-padrão de células normais LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de *U. baccifera*



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; 10⁵ células por poço.

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

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 1 - Percentual de viabilidade celular (VC) das células normais LLC-MK2 tratadas as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de *U. baccifera*

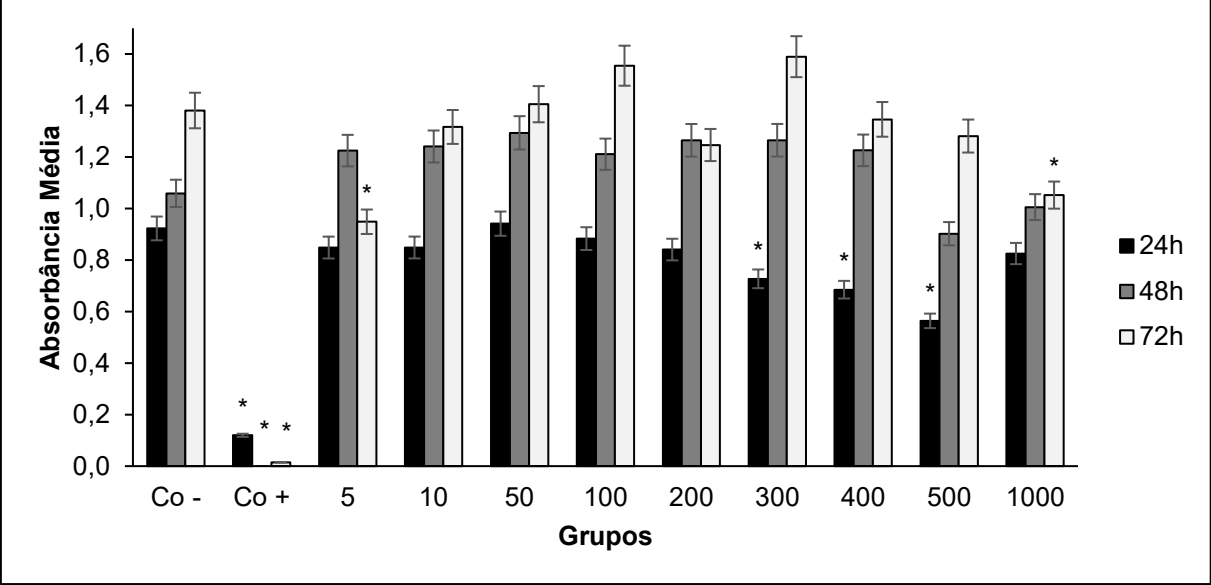
Grupos	LLC-MK2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	7,65	10,83	27,79
5	105,35	136,59	93,65
10	97,33	111,98	83,59
50	106,62	108,88	102,47
100	118,44	117,37	89,68
200	104,66	94,56	90,72
300	95,71	83,73	77,72
400	108,44	64,65	70,38
500	99,40	57,51	97,14
1000	98,42	67,05	99,64

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

Fonte: Autoria própria (2023)

Para a linhagem tumoral hepática humana (HUH7.5) (Gráfico 4) os resultados mostram que as concentrações de 300, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 24 horas e de 5 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 72 horas foram citotóxicas para esta linhagem celular. Inclusive, as viabilidades celulares atingiram 61,12% (500 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 24 horas e 68,72% (5 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 72 horas (Tabela 2).

Gráfico 4 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais hepáticas humanas HUH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de *U. baccifera*



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; 10⁴ células por poço.

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

Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 2 - Percentual de viabilidade celular (VC) de células tumorais HUH7.5 tratadas as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de *U. baccifera*

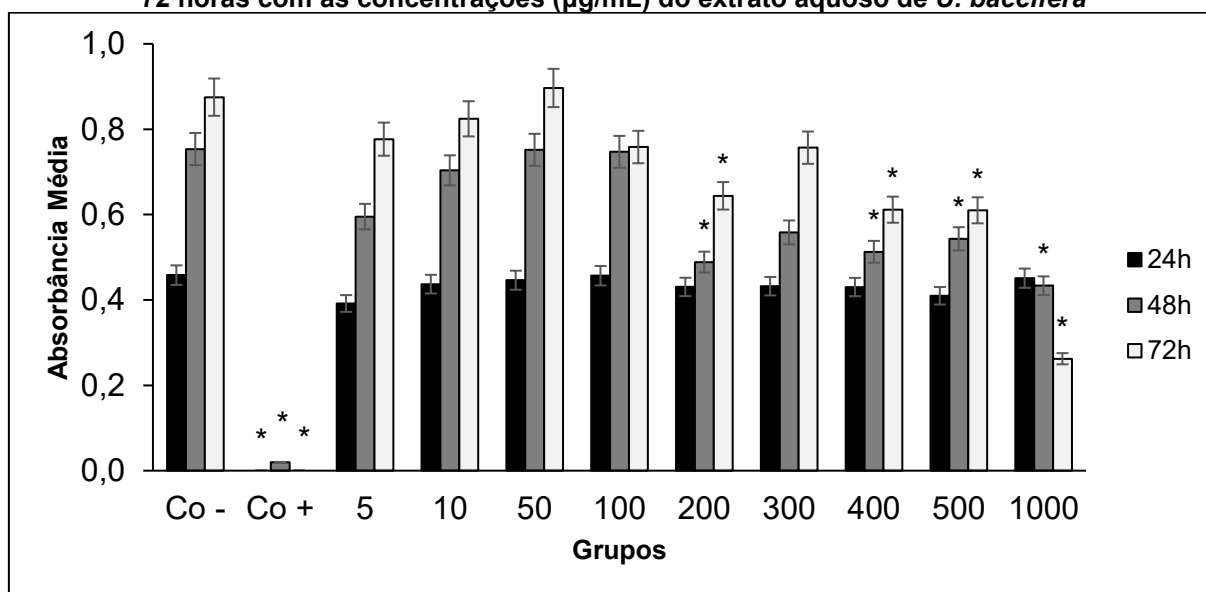
Grupos	HUH7.5		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	12,98	0,00	1,07
5	91,96	115,68	68,72
10	91,98	117,19	95,37
50	102,01	122,19	101,77
100	95,73	114,35	112,59
200	91,11	119,45	90,30
300	78,80	119,48	115,14
400	74,23	115,77	97,50
500	61,12	85,21	92,81
1000	89,44	94,96	76,20

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

Fonte: Autoria própria (2023)

Para a linhagem tumoral hepática de *R. norvegicus* (HTC) (Gráfico 5) os resultados estatisticamente diferentes do controle negativo, que mostram a atividade citotóxica do extrato de *U. baccifera*, foram para as concentrações de 200, 400, 500 e 1000 µg/mL nos tempos de 48 e 72 horas. Já as viabilidades celulares atingiram 57,53% e 29,97% para a concentração de 1000 µg/mL nos tempos de 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela 3). No tempo de 72 horas, a partir da concentração de 300 µg/mL é possível verificar um efeito dependente da dose, em que, quanto maior a dose menor a viabilidade celular. E, para as concentrações de 500 e 1000 µg/mL é possível verificar efeito do tempo de exposição, em que, quanto maior o tempo de avaliação menor a viabilidade celular.

Gráfico 5 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais HTC tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (µg/mL) do extrato aquoso de *U. baccifera*



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; 2×10^4 células por poço.

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

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados mostram que, apesar de o extrato ter sido citotóxico para as células normais no tempo de 48 horas, as células conseguiriam se recuperar e voltar ao seu crescimento e atividade metabólica com o tempo, pois em 72 horas nenhuma concentração foi citotóxica. Entretanto, para as linhagens tumorais com o passar do tempo (24 para 72 horas) o efeito citotóxico foi mais evidente, mostrando que o

crescimento das células tumorais é mais afetado pela exposição ao extrato de *U. baccifera*.

Tabela 3 - Percentual de viabilidade celular (VC) de células tumorais HTC tratadas com as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de *U. baccifera*

Grupos	HTC		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	0,00	2,59	0,00
5	85,51	79,00	88,76
10	95,39	93,38	94,20
50	97,40	99,75	102,47
100	99,70	99,13	86,64
200	93,97	64,86	73,59
300	94,35	74,09	86,47
400	93,91	68,04	69,88
500	89,44	72,09	69,70
1000	98,44	57,53	29,97

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

Fonte: Autoria própria (2023)

Este efeito pode ser devido a presença de antioxidante no extrato, como indicado anteriormente. Os metabolitos secundários extraídos de plantas podem ser divididos em três grandes grupos, sendo eles os fenólicos, compostos nitrogenados e terpenóides (TAIZ *et al.*, 2017). Uma grande aplicação destes metabolitos secundários está na utilização dos antioxidantes como compostos anticâncer (FRANCO *et al.*, 2021, LIMA, 2013). Os antioxidantes têm a capacidade de neutralizar os radicais livres produzidos pelo metabolismo celular ou por fontes externas. Eles impedem que esses radicais livres ataquem os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, as duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA. Isso evita a formação de lesões e a perda da integridade celular (SILVA; BRITO, 2021).

O trabalho de Benvenuto *et al.* (2019) avaliou extratos de *U. baccifera* produzidos com uma mistura hidroalcóolica e com diclorometano como solvente. Os resultados mostraram que o extrato hidroalcóolico não apresentou atividade contra

carcinoma de ovário (linhagem celular OVCAR-3), enquanto o extrato com diclorometano apresentou atividade moderada contra esta linhagem celular, no tempo de 48 horas (BENVENUTTI *et al.* 2019). Estes dados mostram que dependendo do solvente utilizado a qualidade do extrato em termos biológicos pode ser influenciada.

Desta forma, sugere-se a avaliação de outros extratos de *U. baccifera*, que possam apresentar efeitos citotóxicos ainda mais evidentes para as células tumorais, sem ou com pouco efeito para as células normais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram obtidos extratos de *Urera baccifera* L. Gaudich ex Wedd via maceração com água como solvente em temperatura ambiente e através do uso do sistema Soxhlet utilizando os solventes etanol, água e hexano. Os extratos obtidos com água apresentaram compostos luminescentes.

O extrato aquoso via maceração no tempo em que o gradiente de concentração foi praticamente zero (30 minutos), apresentou atividade antioxidante de $149,18 \pm 14,47 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{gDPPH}$

Apesar de não possuir uma elevada concentração de antioxidantes no extrato aquoso o teste de citotoxicidade revelou que o extrato, em concentrações acima de 400 $\mu\text{g/mL}$ foi citotóxico para as linhagens tumorais hepáticas utilizadas no presente estudo (HUH7.5 e HTC), nos tempos de 24 (HUH7.5), 48 (HTC) e 72 horas (HUH.7.5 e HTC). Sendo mais evidente seu efeito para as células HTC, atingindo viabilidade celular de 29,97%. Para a linhagem celular normal (LLC-MK2) foi notado concentrações citotóxicas, contudo tal efeito não se manteve com o passar do tempo.

Sugere-se a avaliação de outros extratos de *U. baccifera*, que possam apresentar efeitos citotóxicos ainda mais evidentes para as células tumorais, sem ou com pouco efeito para as células normais.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. 126 p. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 30 maio 2023.

BCRJ. **Citotoxicidade**. Disponível em: <https://bcry.org.br/servicos/estudos-de-toxicidade-e-dema-is-estudos-in-vitro/citotoxicidade/>. Acesso em: 30 mai. 2023.

BENVENUTTI, R. C. *et al.* Antiproliferative Effect of *Urera baccifera* Leaves Against Ovarian Carcinoma Cell Line (OVCAR-3). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S.l.], v. 62, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180531>. Acesso em: 30 mai. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de Fitoterápico e Plantas Medicinais: Linha do Tempo**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/programa-de-fitoterapico-e-plantas-medicinais/arquivos/linha-do-tempo/renisus.pdf/view>. Acesso em: 07 mai. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Complexo da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica - DAF. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) - 2022**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/renome/20210367-renome-2022_final.pdf/view. Acesso em: 07 mai. 2023.

CAVALHEIRO, M. *et al.* Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 6, n. 1, p. 72-83, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01047>.

FRANCO, D. P.; *et al.* A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 300-312, 2021.

FREIRE, M. E. M.; COSTA, S. F. G.; LIMA, R. A. G.; SAWADA, N. O. Qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com câncer em cuidados paliativos. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 27, n. 2, e5420016, 2018. DOI: 10.1590/0104-070720180005420016.

GINDRI, A. L.. **Análise das atividades farmacológicas e toxicidade de *Urera baccifera* Gaudich**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/18105>. Acesso em: 30 mai. 2023.

GINDRI, A. L.; SOUZA, L. B. de; ATHAYDE, M. L. Caracterização botânica da urtiga-brava: estudos farmacológicos e químicos. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 125-136, 2013.

GOMES, L. S.; NASCIMENTO, V. Extração de Gorduras Totais de Chocolates por Soxhlet e Avaliação Qualitativa da Capacidade Antioxidante. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 4, p. 1239-1248, 2019.

GOMES, M. A. *et al.* Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.

GOMES, R. N., *et al.* Desenvolvimento da química verde no cenário industrial brasileiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Edição especial, p. 80-89, 2018. Disponível em: www.revistafitos.far.fiocruz.br. Acesso em: 30 maio 2023.

LIMA, Fernanda Oliveira. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais**. 2013. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

MACEDO, J. Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais. **Revista Fitos**, v. 1, n. 62, p. 32-39, 2016. Disponível em: www.revistafitos.far.fiocruz.br.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Conheça mais sobre o ReniSUS**. Disponível em: www.gov.br. Acesso em: 20 mai 2023.

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, 16 dez. 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. **Langmuir**, [S.l.], v. 32, n. 13, p. 3217-3225, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00214>. Acesso em: 20 abr. 2023.

ORTIZ, R. W. P. **Estudo teórico e experimental da extração de café com ciclos de compressão e descompressão hidrostática**. 2015. 90f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná - 2015

PEDROSO, R. dos S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>. Acesso em: 05 mai. 2023.

PIRES, T. C. M.; RIBEIRO, M. G. T. C.; MACHADO, A. A. S. C. Extração do R-(+)-Limoneno a partir das Cascas de Laranja: Avaliação e Otimização da Verdura dos Processos de Extração Tradicionais. **Química Nova**, [S.l.], v. 41, n. 3, p.355–365, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180531>. Acesso em: 30 mai. 2023.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Estado da Saúde. Portaria SES/RS nº 588/2017. Institui a Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul e listas complementares. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2017

RODRIGUES, P. S. de M. *et al.* Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da Terminalia fagifolia Mart. sobre células normais e tumorais. **Journal of Health & Biological Sciences**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 16-23, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unichristus.edu.br/jhbs/article/view/1068>. Acesso em: 20 abr. 2023.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007

SANTOS, M. de O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. e–213700, 2023. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>. Acesso em: 30 mai. 2023.

SANTOS, R. F. **Aproveitamento de frutas nativas para elaboração de farinhas e incorporação em biscoitos tipo cookies**. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.

SANTOS, V. A. M. *et al.* Cytotoxicity of capsaicin and its analogs in vitro. **Brazilian Journal of Biology**, [S.l.], v. 83, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.268941>.

SCHWIRKOWSKI, P. **Projeto Flora de São Bento do Sul - SC**. 2009. Disponível em: <https://sites.google.com/site/florasbs/>. Acesso em: 20 mai. 2023.

SCIENCE IN SCHOOL. O que é a quimioluminescência? Disponível em: <https://www.scienceinschool.org/pt-pt/article/2011/chemiluminescence-pt-pt/>. Acesso em: 12 mai 2023

SILVA, Aline Roberta Rodrigues da; BRITO, Patrícia Dias de. Níveis séricos de antioxidantes e sua suplementação em pessoas vivendo com HIV: revisão integrativa. **Revista Ciência & Saúde**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2021.

SOUZA, R. R.; GASPAROTI, P. S.; PAULA, J. A. M. D. Obtenção de extratos de plantas medicinais: uma revisão de escopo dos métodos extrativos modernos em comparação ao método clássico por Soxhlet. **Movimenta** (ISSN 1984-4298), v. 15, n. 1, maio 2022. DOI:10.31668/movimenta.v15i1.12870.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, Feb. 2021. DOI 10.3322/caac.21660.

TAIZ, L.; *et al.* Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 888 p.

VANIN, C. R. **Araçá amarelo: atividade antioxidante, composição nutricional e aplicação em barra de cereais**. 2015. 117 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

VENDRUSCOLO, I. *et al.* Cytotoxicity of extracts and compounds isolated from *Croton echinoides* in animal tumor cell (HTC). **Brazilian Journal of Biology**, [S.l.], v. 82, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.264356>.

YU, Manyou *et al.* Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 11, n. 10041, maio 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89437-4>. Acesso em: 12 mai 2023