

Iria Pedroso da Cunha

**CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS DO COZIMENTO
DO PINHÃO VAR. *angustifolia* E PINHÃO MACACO
VAR. *indehiscens* DA *Araucaria angustifolia* (BERT.)
[OTTO KUNTZE]**

Florianópolis
2019

Iria Pedroso da Cunha

**CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS DO COZIMENTO
DO PINHÃO VAR. *angustifolia* E PINHÃO MACACO
VAR. *indehiscens* DA *Araucaria angustifolia* (BERT.)
[OTTO KUNTZE]**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
doutora em Ciência dos Alimentos.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edna Regina
Amante

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, Iria Pedroso da
CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS DO COZIMENTO DO PINHÃO
VAR. angustifolia E PINHÃO MACACO VAR. indehiscens
DA Araucaria angustifolia (BERT.) [OTTO KUNTZE] /
Iria Pedroso da Cunha ; orientadora, Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Edna Regina Amante, 2019.
107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Pinhão comum. 3.
Pinhão macaco. 4. Extrato aquoso de pinhão. 5.
Bioacessibilidade in vitro. I. Amante, Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Edna Regina . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos. III. Título.

CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS DO COZIMENTO DO
PINHÃO VAR. angustifolia E PINHÃO MACACO VAR.
indehiscens da *Araucaria angustifolia* (BERT.) [OTTO
KUNTZE]

Por

Iria Pedrosa da Cunha

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“**Doutora** em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 05 de abril de 2019

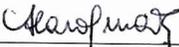

Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

Banca Examinadora:


Prof.(a). Dr.(a). Edna Regina Amante
Orientador (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Critiane Vieira Helm
Membro (EMBRAPA)


Prof.(a). Dr.(a). Elane Schwinden Prudêncio
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Deise Helena Baggia Ribeiro
Membro (UFSC)

Profa Dra Ana Carolina de Oliveira
Costa
Coord do Programa de Pós-Graduação
em Ciências dos Alimentos
Portaria nº 806/GR/2016

Aos meus amados filhos Pedro Arthur, Yasmin e Márcio. Aos meus pais Gil e Maria Herminia pelo apoio e amor incondicional. E à minha querida amiga e incentivadora Ana Bernadete Turnes (In memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente mesmo nos momentos mais difíceis. **“Meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus, eu confio em ti! Caiam mil ao seu lado e dez mil à sua direita, a você nada atingirá.”** Salmo 91: 2,7.

Especialmente à minha orientadora, Professora Edna Regina Amante, que acreditou, incentivou e acima de tudo me viu como um ser humano que tem defeitos, qualidades e que enfrentou adversidades inesperadas. Muitos duvidaram que eu chegasse ao fim, talvez até eu mesma, mas ela continuou firme e otimista, sempre acreditando que esse dia iria chegar. Ela me ensinou acima de tudo que ser Mestre é verdadeiramente ser discípulo. Obrigada de coração por me ajudar a vencer e a atravessar essa trajetória na minha vida. Que Deus a abençoe.

À minha querida amiga e colega Denise Wibelinger de Melo por toda a ajuda e paciência na execução desse trabalho. Por segurar a minha mão quando precisei, por puxar minha orelha na hora certa e acima de tudo por me mostrar que um dia somos o mestre e no outro o pupilo.

Ao meu amigo Luis Eduardo S. Nascimento pela ajuda e seu carinho na realização deste trabalho. Acima de tudo por me mostrar sua fé inabalável.

À minha amiga Bianca D’arck Melo Cavalcante pelo auxílio na realização de algumas análises e pelas suas palavras de carinho.

A todos os professores do PPGCAL que contribuíram para a minha formação durante o Doutorado.

À querida Professora Elane Schwiden Prudêncio pela parceria na realização do meu primeiro artigo, possibilitando a sua publicação. Acima de tudo por suas palavras de carinho e incentivo.

À Silvani Verruck pela parceria no processo de digestão in vitro dos meus extratos, contribuindo para a publicação do meu artigo. Menina doce, carinhosa, sempre com uma palavra amiga.

À Bruna Maran por contribuir com o desenvolvimento dos experimentos do meu artigo.

À Professora Deise Helena Baggio Ribeiro por sempre me escutar, por todo carinho, incentivo e ajuda durante as análises antimicrobianas.

À querida Meri Beatriz Zaneti técnica do Laboratório de Nutrição Animal/DZDR por colaborar na realização de algumas análises, pela sua amizade e carinho.

À Professora Renata Dias de Mello Castanho Amboni por permitir a utilização de equipamentos e a realização de análises no Laboratório de Frutas e Hortaliças (LFH).

À colega do LFH Carolinne Dias por gentilmente fornecer amostras de pinhão comum e me ajudar com as análises de cor.

Ao Professor Luciano Vitalli pela parceria na realização das análises por HPLC – ESI – MS/MS.

Fabíola Carina Biluca por seu auxílio na interpretação dos dados das análises por HPLC – ESI – MS/MS.

Ao querido Sérgio de Souza secretário do PPGCAL por toda a sua presteza, carinho e amizade. Valeu Serjão!

Aos técnicos do LAMEB minha gratidão pela parceria para realização das análises microscópicas de fluorescência e óptica de luz. Meu agradecimento especial a Chirle Ferreira por toda a ajuda e paciência. Meu muito obrigada à bolsista Camilla.

Ao LCME por ter permitido que eu realizasse as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, em especial a Técnica Márcia Regina Fanta por ter me auxiliado.

Ao Departamento de Ciências Morfológicas por ter me liberado para a conclusão do Doutorado.

Aos meus colegas de Departamento Professores Ericsson Kubrusly Gonçalves e Rejane Maria Cirra Scaff por incentivarem e acreditarem.

Aos técnicos de Histologia Gilberto, Bel, Maneca e Rui pelo carinho e incentivo.

À minha querida nora Rafaela por todo apoio e carinho.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pelas suas valiosas contribuições ao trabalho.

À Profa. Dra. Ana Carolina Aquino pelas suas contribuições na banca de defesa de qualificação.

“Família é onde a vida começa e o amor não tem fim.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

A semente da *Araucaria angustifolia*, denominada pinhão, é consumida após cozimento em água, em geral, com sal. As cascas e as águas de cozimento constituem resíduos. Embora as cascas tenham sido estudadas quanto às suas propriedades, as águas de cozimento apresentam escassos estudos. Além do pinhão comumente conhecido, denominado neste trabalho de pinhão comum, o pinhão macaco, com ocorrência tardia, comparativamente à safra do comum, apresenta um menor número de estudos, tanto das sementes quanto das águas de cozimento. Este trabalho estudou as águas de cozimento dos pinhões comum e macaco, obtidas em diferentes tempos, com e sem sal, quanto à presença de compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e biodigestibilidade de polifenóis em digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. Ácido protocatecuico, vanilina e coniferaldeído foram identificados e quantificados por HPLC-ESI-MS/MS. As águas de cozimento sem sal dos pinhões comum e macaco, obtidas no tratamento por 45 minutos apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais e maior atividade antioxidante por DPPH e FRAP. As águas dos dois tipos de pinhão obtidas em todos os tratamentos não apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas. Embora comparativamente ao pinhão comum, o pinhão macaco tenha apresentado a menor atividade antioxidante no tratamento por 45 minutos, sem sal e os dois extratos apresentem atividade antioxidante e compostos fenólicos bioacessíveis, a diminuição gradual da bioacessibilidade do extrato de pinhão macaco durante as etapas de digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, caracteriza esse extrato como com melhor propriedade funcional.

Palavras-chave: Pinhão comum; Pinhão macaco; Extrato aquoso de pinhão; Compostos fenólicos; Bioacessibilidade *in vitro*; Propriedades funcionais; Pinhão comum e pinhão macaco

ABSTRACT

Araucaria angustifolia seeds, called “pinhão”, are consumed after cooking in water, usually with salt. Bark and cooking water are waste. Although the shells have been studied for their properties, the cooking waters have scarce studies. In addition to the commonly known pinhão, referred to in this work as the common pinhão, the monkey pinhão, with late occurrence, compared to the common season, presents less studies, both seeds and cooking waters. Therefore, this work studied the cooking waters of common and monkey pinhão, obtained in different times, with and without salt, regarding the presence of phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity and biodigestibility of polyphenols in simulated gastrointestinal digestion *in vitro*. Protocatechuic acid, vanillin and coniferaldehyde were identified and quantified by HPLC-ESI-MS / MS. The saltless cooking waters of the common and monkey pinhão, obtained in the treatment for 45 minutes presented the highest total phenolic compounds contents and higher antioxidant activity by DPPH and FRAP. The waters of the two types of pinhão obtained by all treatments did not present antimicrobial activity against bacteria tested. Compared to the common pinhão, the monkey pinhão presented the lowest antioxidant activity in the treatment for 45 minutes without salt and the two extracts presented antioxidant activity and bioaccessible phenolic compounds, the gradual decrease of the bioaccessibility of the monkey pinhão extract during the gastrointestinal digestion stages *in vitro*, characterizes this extract with the better functional properties.

Keywords: Pinhão comum; Pinhão macaco; Aqueous extract of pinhão; Phenolic compounds; Bioavailability *in vitro*; Functional properties.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Araucária (<i>Araucaria angustifolia</i>).....	31
Figura 2 - Mapa de ocorrência natural da <i>Araucaria angustifolia</i>	32
Figura 3 - Mudanças que ocorrem na planta (pinheiro) com o decorrer do tempo.	33
Figura 4 - Casca ou tegumento e amêndoa do pinhão.	35
Figura 5 - Diferenças entre o pinhão macaco e o pinhão comum.	37
Figura 6 - Pinhas do pinhão macaco (A e B) e pinhão comum (C e D)	38
Figura 7 - Principais flavonoides encontrados nos extratos do pinhão.	40

CAPÍTULO 2

Figura 8 - Resultados da microscopia de fluorescência dos sólidos presentes nas águas de cozimento do pinhão comum e macaco tempo de 45 minutos sem sal.	68
Figura 9 - Cromatograma representativo da identificação de compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS em água de cozimento do pinhão comum com cocção a 45 minutos sem sal.	72

CAPÍTULO 3

Figura 10 - Pinhão comum e pinhão macaco.....	84
Figura 11 - Diagrama do preparo dos extratos do pinhão ‘comum’ e ‘macaco’.	86
Figura 12 - Protocolo dos extratos de pinhão sob condições gastrintestinais simuladas in vitro.....	87
Figura 13 - Teor de compostos fenólicos totais (CFT) do extrato (a), pinhão ‘comum’ (inicial) e (b) extrato pinhão ‘macaco’.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Produção de pinhão no Brasil e nos principais estados produtores.....	36
Tabela 2 - Composição da amêndoa do pinhão comum cru e cozido... 36	

CAPÍTULO 2

Tabela 3 - Parâmetros de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, cinzas e proteínas solúveis nas águas de cozimento do pinhão comum e macaco, em diferentes tempos de cozimento, com e sem sal.	65
Tabela 4 - Avaliação dos parâmetros de cor L*, a* e b* frente ao tempo de cozimento da água de cozimento do pinhão comum e macaco com e sem sal.	67
Tabela 5 - Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) das águas de cozimento do pinhão comum e macaco, em diferentes tempos, com e sem sal.	69
Tabela 6 - Compostos fenólicos (HPLC-MS) das águas de cozimento do pinhão comum e macaco com e sem sal.	71

CAPÍTULO 3

Tabela 7 - Resultados da bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais (CFT) (media \pm desvio padrão) do extrato pinhão comum e do extrato pinhão-macaco após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas.	91
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	coordenadas de cor vermelho/verde
ANOVA	análise de variância unidirecional
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATT	Acidez Total Titulável
b*	coordenadas de cor amarelo/azul
BHI	brain -heart infusion broth
C3	pinhão comum sem sal cozimento de 45 minutos
C6	pinhão comum com sal cozimento de 45 minutos
CA	Califórnia
Caco-2	linhagens celulares provenientes do epitélio do coloretal humano
CFT	compostos fenólicos totais
CFTA	teor fenólico quantificado após etapas de condições gastrointestinais simuladas
CFTB	teor fenólico quantificado antes do estímulo gastrointestinal (inicial)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	equivalentes de ácido gálico
EPC	extratos concentrados de pinhão comum
EPM	extratos concentrados de pinhão macaco
FRAP	poder antioxidante redutor férrico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-ESI-MS/MS	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com analisador triploquadropolo e ion trap linear
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISSN	<i>International Standard Serial Number</i>
L*	Luminosidade
M3	pinhão macaco sem sal cozimento 45 minutos

M6	pinhão macaco com sal cozimento de 45 minutos
MH	Ágar Mueller Hinton
PC	pinhão comum
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	pinhão macaco
RJ	Rio de Janeiro
S	Sul
SC	Santa Catarina
SST	Sólidos Solúveis Totais
TE	Trolox equivalente
TPTZ	2,2'-2,4,6-tripiridiltriazina
TSA	ágar tripticase de soja
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
var.	variedade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1.....	29
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
1.1 ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA.....	30
1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA	31
1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DA ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA	32
1.4 PINHÃO.....	35
1.4.1 Pinhão macaco (<i>Araucaria angustifolia</i> var. <i>indehiscens</i>)	36
1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	38
1.6 FLAVONOIDES.....	39
1.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
1.8 COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS	41
1.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	42
1.10 BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE.....	42
1.11 PROPRIEDADES FUNCIONAIS	43
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 2.....	53
ÁGUAS DO COZIMENTO DE DUAS VARIEDADES DE PINHÃO (<i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> (BERT.) OTTO KUNTZE): AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS ...	53
CAPÍTULO 3.....	79
BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> DURANTE A DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA <i>IN VITRO</i>.	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
ANEXOS	101

ANEXO A – ARTIGO “COOKING WATER OF SEEDS FROM TWO VARIETIES OF <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> (BERT.) OTTO KUNTZE); COMPARATIVE EVALUATION OF PHENOLIC COMPOSITION ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES.” SUBMETIDO À REVISTA LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (ISSN: 0023-6438).	102
ANEXO B – APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS DE TODOS OS COMPOSTOS PADRÕES UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR E QUANTIFICAR OS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE COZIMENTO DO PINHÃO MACACO E COMUM.....	103
ANEXO C – ARTIGO “BIOACCESSIBILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS OF <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> FROM SEED WATER EXTRACTS DURING <i>IN VITRO</i> SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS.” PUBLICADO NA REVISTA FOOD AND NUTRITION SCIENCE	107

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um país com uma grande biodiversidade, cujos recursos naturais, quando valorizados de modo sustentável, são capazes de ajudar no seu desenvolvimento. A utilização desses recursos pode ser considerada como uma grande oportunidade, gerando novas alternativas econômicas, bem como a conservação do ecossistema (BRASIL et al., 2006).

A avaliação de matérias primas nativas brasileiras, mesmo aquelas de ocorrência natural, pode conduzir à valorização econômica e incentivo aos pequenos produtores rurais. Um grande exemplo está na exploração do pinhão, semente da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze (WENDLING; ZANETTE, 2017), coletado de modo sazonal por agricultores das regiões produtoras.

O aumento do potencial econômico da Araucária poderá estimular a sua preservação e expansão territorial, além de gerar renda às famílias de pequenas propriedades rurais, trazendo assim benefícios econômicos, concomitante aos ganhos ambientais. Existem várias áreas de pesquisas e trabalhos a respeito de diversos aspectos da planta, porém, são encontrados poucos estudos envolvendo a exploração tecnológica do pinhão e de seus subprodutos, principalmente que seja compatível com a realidade do micro e pequeno proprietário rural (BRASIL et al., 2006; PERALTA et al., 2016).

Os estudos sobre a porção comestível do pinhão podem ser encontrados, mas sempre abordando a composição nutricional e desenvolvimento de produtos tais como: farinhas (COSTA et al., 2012; CORNEJO et al., 2014; CAPELLA et al., 2009), conservas (CONTO; IDE, 2015) e até bebidas alcoólicas (BATISTA, 2014; CONTO et al., 2016).

O pinhão é ingerido como alimento após o seu cozimento em água ou assado, gerando dois importantes resíduos: a casca e a água do cozimento, ambas consideradas ricas em compostos bioativos, apresentando excelente potencial tecnológico para a aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (LEITE et al., 2008; PERALTA et al., 2016). O pinhão costuma ser consumido principalmente entre os meses de abril e julho, gerando toneladas de cascas e milhares de litros de água resultantes do seu cozimento. As cascas e as águas de cozimento costumam ser descartadas no meio ambiente, embora biodegradáveis, o descarte pode representar a perda de oportunidade de ampliação de lucro ou utilização dos seus benefícios.

Ao identificar perspectivas funcionais nas cascas e nas águas de cozimento, surgem novas oportunidades, além de efetivamente contribuir para justificar a preservação dos pinheiros. Ao mesmo tempo, as águas residuais do cozimento, não são obtidas em escala industrial, mas no momento do preparo, em residências, restaurantes comerciais ou institucionais e, os pinhões são empregados para os diversos produtos já propostos, com a evolução do uso, também em agroindústrias. No entanto, até o momento, as águas de cozimento não foram estudadas com o propósito de justificar a sua aplicação.

Embora o pinhão comum variedade *angustifolia* seja o mais conhecido, existem poucos relatos na literatura sobre o pinhão macaco var. *indehiscens* da *Araucaria angustifolia* (BERT.) [OTTO KUNTZE]. Porém, este possui ocorrência nas mesmas regiões do pinhão comum.

Considerando estas perspectivas e os poucos trabalhos científicos sobre os compostos presentes nas águas de cozimento do pinhão, as sugestões para novas aplicações para os resíduos, necessitam de aprofundamento científico quanto às propriedades e segurança do consumo. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar as águas de cozimento do pinhão em diferentes tempos e verificar a influência da adição de sal durante o cozimento, prospectando a partir destas características, sugestões para aplicações, valorização e desenvolvimento de novos produtos.

O trabalho está apresentado em três capítulos, sendo **CAPÍTULO 1** – Revisão Bibliográfica; **CAPÍTULO 2** – Água do cozimento de duas variedades de pinhão (*Araucaria angustifolia* (bert.) [otto kuntze]): avaliação comparativa da composição fenólica e atividades antioxidantes e antimicrobianas e **CAPÍTULO 3** – Bioacessibilidade de compostos fenólicos do extrato aquoso de sementes de *Araucaria angustifolia* durante a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BRASIL, J. L.; EVA, R. R.; MILCHAREK, C. D.; MARTINS, L. C.; PAVAN, F. A.; SANTOS-JR., A. A.; DIAS, S. L.; DUPONT, J.; ZAPATA, N.C. P.; LIMA, E.C. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr (VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes. **Journal of Hazardous Materials**. v.133, p. 143-153, 2006.
- BATISTA, R. A. R. **Produção e avaliação sensorial de cerveja com pinhão (*Araucaria angustifolia*)**. Dissertação de Mestrado. Lorena. Universidade de São Paulo. 2014. 108 p.
- CAPELLA, A. C. V; PENTEADO, P. T. P. S; BALBI, M. E. **Semente de *Araucaria angustifolia*: Aspectos morfológicos e composição química da farinha**. **B.CEPPA**, Curitiba v. 27, n. 1, p. 135-142, 2009.
- CONTO, L. C.; IDE, G.M. Avaliação físico-química e sensorial de conservas de pinhão (*Araucaria angustifolia*) processadas em diferentes meios de acidificação. **Ambiência**, v.11, n.2, p. 443-455, 2015.
- CONTO, C.; PEREIRA, A.; FERREIRA, P. E.; BERGER, C. Avaliação de cerveja tipo pale ale produzida com malte de pinhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25., Gramado. **Anais...** Gramado: FAURGS, 2016.
- COSTA, A.; HELM, C.V.; TAVARES, L.B.B. Obtenção e caracterização de farinha de endosperma e de casca de pinhão para fins alimentícios. In: **Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas**, 11., **Anais...** 2012.
- CORNEJO, F.E.P.; NOGUEIRA, R. I.; de CARVALHO, C.W.P.; de GODOY, R.C B.; OLIVEIRA, A. H.; SANTOS, L. F. CAVALCANTI; BARRETO, A. G.; FREITAS, S. P. **Descascamento e secagem de pinhão (*Araucaria angustifolia*) para a obtenção de farinha**. Comunicado Técnico 206, Embrapa, Rio de Janeiro, RJ, 2014. 3p.
- LEITE, D. M. C; JONG, E. V. DE; NOREÑA, C. P. Z; BRANDELLI, A. Nutritional evaluation of *Araucaria angustifolia* seed flour as a protein complement for growing rats. **Science of Food and Agriculture**, v. 88, n.7, p. 1166-1171, 2008.
- PERALTA, R. M.; KOEHNLEIN, E. A.; OLIVEIRA, R. F.; CORREA, V. G.; CORREA, R. C. G.; BERTONHA, L.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**, v.54, p.85-93, 2016.
- WENDLING, I.; ZANETTE, F. **Araucária particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa Florestas: Colombo – PR, 2017. 163p.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA

Pertencente à família *Araucariaceae*, a espécie *Araucaria angustifolia* foi descrita por Bertoloni em 1820 como *Columbea angustifolia* Bert., posteriormente foi redescrita por Richard em 1922 como *Araucaria brasiliana* Rich. e retificada por Otto Kuntze como *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze (SOARES; MOTA, 2004).

A *Araucaria angustifolia* é a única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil (MATTOS, 2011) (Figura 1), popularmente conhecida por diversos nomes, tais como: pinheiro, pinheiro-araucária, pinheiro-do-Paraná, pinheiro-branco, pinheiro-brasileiro, pinheiro-nacional, pinheiro-das-missões, pinheiro-caiová, pinheiro-cajová, pinheiro-cajuvú, pinheiro-chorão, pinheiro-elegante, pinheiro-macaco, pinheiro-macho-fêmea, pinheiro-de-ponta-branca, pinheiro-preto, pinheiro-rajado, pinheiro-são-josé, pinheiro-de-são-paulo, pinhão, pinho, pinho-brasileiro, pinho-do-Paraná, ou simplesmente, araucária (CARVALHO, 1994; REITZ; KLEIN, 1988; LORENZI, 2000).

A espécie está ameaçada de extinção, em vista da exploração desenfreada de sua madeira e pela falta de incentivo ao seu plantio e manejo, sendo ainda encontrada em pequenas propriedades principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná e alguns estados da região sudeste, representando uma pequena área de apenas 1 % da cobertura protegida de florestas nativas (WENDLING; ZANETTE, 2017; ORELLANA; VANCLAY, 2018).

A araucária é uma espécie de grande importância social, econômica, ambiental e cultural para as regiões produtoras, o desenvolvimento de tecnologias e a utilização dos produtos não madeireiros da araucária como é o caso dos pinhões, e das brácteas, podem contribuir para a manutenção e incentivar o reflorestamento da espécie (WENDLING; ZANETTE, 2017).

Figura 1 - Araucária (*Araucaria angustifolia*).

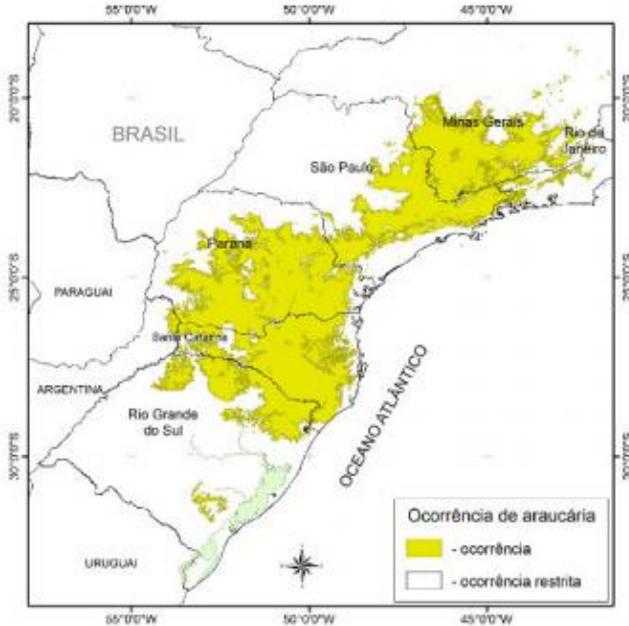


Fonte: A autora (2019).

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA

Pertencente a Floresta Ombrófila Mista, a *Araucaria angustifolia* ocorre principalmente na regiões sul e sudeste do Brasil fazendo parte do bioma Mata Atlântica (SOUZA, 2017; ORELLANA; VANCLAY, 2018). Os limites de distribuição da *A. angustifolia* são: ao Norte, no Rio Doce, em Minas Gerais (cerca de 18° S de latitude); ao Sul, na Serra do Sudeste, no Rio Grande do Sul (até cerca de 31.5° S de latitude); à Leste, nos divisores de água da Serra do Mar e no limite das escarpas do Planalto Sul-Brasileiro, a mesma também pode ser encontrada na região nordeste da Argentina e no leste do Paraguai (HUECK, 1972; MATTOS, 2011; SANTOS et al., 2018) (Figura 2). Nas áreas de campo, a araucária é uma espécie facilitadora, criando condições mais propícias para o estabelecimento de outras espécies.

Figura 2 - Mapa de ocorrência natural da *Araucaria angustifolia*.



Fonte: Adaptado de Wrege et al. (2016).

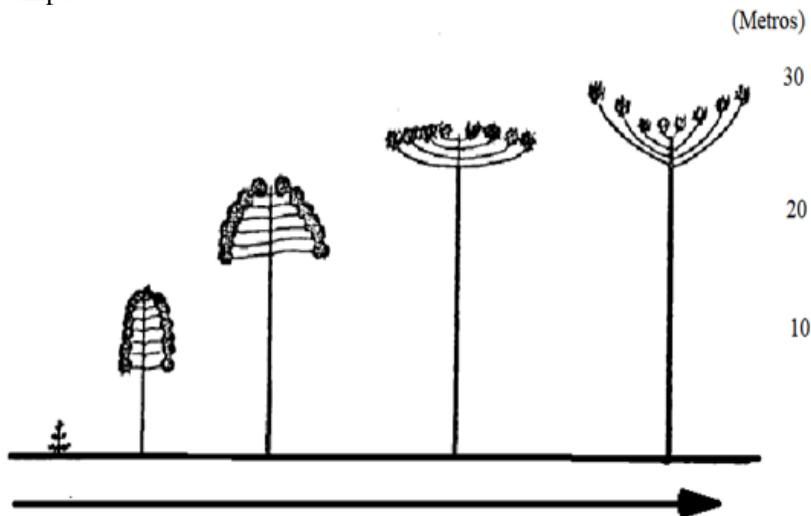
1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DA ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA

A *Araucaria angustifolia* pertence ao reino *Plantae*, filo *Gymnospermae*, classe *Coniferopsida*, ordem *Coniferae*, família *Araucariaceae*, gênero *Araucaria*, espécie *angustifolia*, é uma árvore perene, de porte alto, podendo atingir entre 30 a 52 metros de altura, com tronco cilíndrico, quase sempre reto, simples, às vezes com pequenos perfilhos (em números de 1 a 15), com diâmetro entre 1 a 2 metros (REITZ; KLEIN, 1966; MATTOS, 2011; WENDLING; ZANETTE, 2017).

Segundo Mattos (2011), as plantas jovens de *Araucaria angustifolia* possuem formas cônicas, seu crescimento em altura é proporcionalmente mais rápido que o crescimento dos galhos, com o envelhecimento da planta, o comprimento dos galhos nos pseudo-verticilos diminui proporcionalmente à medida que aumenta o comprimento da inserção (Figura 3). Neste estágio a árvore reduz drasticamente o crescimento em altura, porém os galhos continuam

crescendo para fora e para cima, de tal maneira que a gema apical dos galhos mais baixos está em um nível mais alto do que o broto apical, configurando a copa como uma taça (SEITZ, 1986; FRITH, 1966; MATTOS, 2011).

Figura 3 - Mudanças que ocorrem na planta (pinheiro) com o decorrer do tempo.



Fonte: Adaptado de Seitz (1986).

As folhas da *Araucaria angustifolia*, medem cerca de três a seis centímetros de comprimento, são simples, com ápice agudíssimo-pungentes, e apresentam coloração verde-escuro (REITZ; KLEIN, 1979; CARVALHO, 1994; LORENZI, 2000).

É uma planta dioica, isto é, há árvores femininas e masculinas, com suas respectivas inflorescências, às vezes monoicas, por trauma ou doenças, com flores unissexuadas (REITZ; KLEIN, 1966).

A inflorescência masculina possui folhas modificadas que formam os androstróbilos, conhecidos como amento, mingote ou sabugo, que são formados por numerosas escamas inseridas em torno de um eixo alongado, com 10 a 15,5 cm de comprimento, 1,5 a 3,5 de diâmetro, cilíndrico e ligeiramente curvo. Em seu interior estão localizados diversos sacos polínicos, onde se desenvolvem os grãos de pólen (REITZ; KLEIN, 1966; MANTOVANI et al., 2004; ANSELMINI, et al. 2006; MATTOS, 2011).

A inflorescência feminina é constituída por folhas modificadas que formam o ginostróbilo, conhecido como estróbilo, cone ou pinha,

arredondadas, com diâmetro horizontal entre 10 a 22 cm, composta por mais de 600 falhas escamiformes inseridas ao redor de um eixo cônico denominado de sabugo. O óvulo nasce na axila, protegido por uma folha modificada estéril. Esta folha une-se a outra folha modificada estéril envolvendo o óvulo fecundado, formando a semente da araucária, conhecida como pinhão. O ginostrobilo feminino maduro, chamada de pinha, apresenta estruturas: o pinhão (que foi fecundado), o pinhão chocho (que não foi fecundado, é atrofiado) e as escamas de preenchimento (falhas ou brácteas) (REITZ; KLEIN, 1966; MANTOVANI et al., 2004; ANSELMINI, et al., 2006; MATTOS, 2011).

Reitz e Klein (1966) foram os primeiros a relatar sobre a existência de nove variedades e uma forma de *Araucaria angustifolia* com base na coloração das cascas e época do amadurecimento dos pinhões. Porém, Mattos (2011), descreveu somente cinco variedades e uma forma:

- a) *Araucaria angustifolia* var. *angustifolia*: os pinhões apresentam uma coloração vermelha, vermelha tijolo ou amarelada, sem ponta branca, brácteas escamiformes do mesmo tamanho e maturação de fevereiro a julho.
- b) *Araucaria angustifolia* var. *indehiscens*: pinhões com coloração vermelha e base branca ou branco-amarelada, constituída pelo apêndice testáceo que pode alcançar até a metade do seu tamanho. A maturação desta variedade conhecida como pinhão macaco, ocorre nos meses de setembro a janeiro e os pinhões, não se desprendem das pinhas quando maduros. Esta variedade é encontrada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Acha-se em via de extinção, pois não são replantados e também são explorados por madeireiros.
- c) *Araucaria angustifolia* var. *caiova*: pinhões com coloração vermelho-escuro e base branca, sem apêndice testáceo, desprendem-se da pinha quando maduros. Maturação de julho a agosto. Esta variedade é encontrada nos três estados da região sul e também se encontra em perigo de extinção pelos mesmos motivos exibidos na var. *Indeshiscens*.
- d) *Araucaria angustifolia* var. *dependens*: tem grimpas ou ramos secundários não ramificados, pendentes, com até 1,8 m de comprimento. Este pinheiro é encontrado apenas em Mauá – RJ e é conhecido como “pinheiro chorão”. A maturação ocorre no início de agosto.

- e) *Araucaria angustifolia* var. *Vinacea*: apresentam desprendimento de placas da casca de 1,0 a 1,5 mm de espessura, coriáceas (com aparência ou semelhança a couro) de coloração vinácea.
- f) *Araucaria angustifolia* forma *catharinensis*: planta rara, com pinhões com coloração vermelha, com bráctea escamiforme superior ultrapassando a 0,5 cm ou mais ao comprimento da inferior e maturação em julho.

Zechini et al. (2012), identificaram pelo menos três variedades de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC: var. *angustifolia*, conhecido como pinhão comum ou tradicional; var. *indeshiscens*, denominado de pinhão macaco e var. *Caiova* conhecido como pinhão cajuvá ou caiová.

1.4 PINHÃO

O termo pinhão é dado às sementes da *Araucaria angustifolia*, constituídas das seguintes partes: casca ou tegumento, que apresenta coloração vermelho tijolo; amêndoa, que é uma massa amilácea de coloração branca amarelada e o embrião que se localiza no centro da amêndoa e normalmente apresenta uma coloração branca (Figura 4) (MATTOS, 2011).

Figura 4 - Casca ou tegumento e amêndoa do pinhão.



(a) Casca ou tegumento; (b) amêndoa.

Fonte: A autora (2019).

Segundo o IBGE, no ano de 2016, a produção de pinhão no Brasil foi de 7746 toneladas, com destaque para o Paraná e Santa Catarina (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção de pinhão no Brasil e nos principais estados produtores.

	Ano X Tipo de produto extraído		
	2014	2015	2016
Brasil e unidades da Federação	Pinhão (toneladas)	Pinhão (toneladas)	Pinhão (toneladas)
Brasil	8777	8393	7746
Minas Gerais	1162	1213	1090
São Paulo	6	6	6
Paraná	3582	3220	3183
Santa Catarina	3147	3192	2663
Rio Grande do Sul	887	762	805

Fonte: Adaptado do IBGE (2016).

De acordo com Cordenunsi et al. (2004), o teor de água no pinhão cozido chega a 50%, e o amido é o segundo componente principal, com aproximadamente 34 %, o que identifica a semente como uma boa fonte de carboidratos. Com o alto teor de amido, o teor de açúcares solúveis totais (glicose, frutose e sacarose) é pequeno. O pinhão também representa uma boa fonte de fibras totais, com 6 % em média. Os teores aproximados de proteínas (3%) e lipídeos (1,3%) são baixos comparados a outros alimentos ricos em amido, conforme ilustrado na Tabela 2. Os minerais presentes são: fósforo, magnésio, cálcio, zinco, ferro e cobre.

Tabela 2 - Composição da amêndoa do pinhão comum cru e cozido.

Composição (%) em base úmida	Pinhão cru Amêndoa	Pinhão cozido Amêndoa	Pinhão cozido Casca
Umidade	49,5 ± 0,02	50,35 ± 0,71	5,00 ± 0,06
Cinzas	1,60 ± 0,01	1,41 ± 0,02	1,74 ± 0,02
Proteínas	3,57 ± 0,05	3,31 ± 0,05	--
Lipídeos	1,26 ± 0,07	1,26 ± 0,09	--
Fibra solúvel	0,63 ± 0,13	0,55 ± 0,18	--
Fibra insolúvel	4,26 ± 0,20	5,17 ± 0,25	--
Amido	36,28 ± 0,11	34,48 ± 0,72	--
Açúcares solúveis	2,43 ± 0,16	0,64 ± 0,13	--

Fonte: Adaptado de Cordenunsi et al. (2004) e Rezende (2016).

1.4.1 Pinhão macaco (*Araucaria angustifolia* var. *indehiscens*)

O pinhão macaco difere dos demais pinhões por apresentar a ponta branca ou branca amarelada (Figura 5), é de difícil desprendimento da pinha (Figura 6), seu apêndice testáceo pode se estender até a metade do

seu tamanho. Sua maturação é tardia diferente das demais variedades, o pinhão macaco pode ser colhido entre setembro a janeiro (REITZ; KLEIN, 1966; MATTOS, 2011; ZECHINI et al., 2012), devido aos fatores climáticos esse período está se modificando podendo ser encontrados pinhões dessa variedade já no começo de agosto. Tendo ocorrência natural nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Seu nome popular se dá devido ao fato dos macacos bugios se alimentarem desses pinhões (MATTOS, 2011).

Figura 5 - Diferenças entre o pinhão macaco e o pinhão comum.



(a) Pinhão macaco com a presença de ponta branca; (b) pinhão comum sem a presença de ponta branca.

Fonte: A autora (2018).

Figura 6 - Pinhas do pinhão macaco (A e B) e pinhão comum (C e D)



Fonte: A autora (2018).

1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os polifenóis são compostos que derivam da fenilalanina e se caracterizam por apresentar duas ou mais unidades de fenol em sua estrutura (GRANATO, 2016). Sendo compostos provenientes principalmente do metabolismo secundário das plantas, cuja função e variedade estão relacionadas diretamente à defesa dessas. Os compostos fenólicos podem ser divididos em flavonoides e não flavonoides (SOUZA et al., 2014).

Nos últimos anos os fenólicos vêm recebendo maior interesse por parte dos pesquisadores devido ao fato da maioria desses compostos apresentarem atividade bioativa com alegações funcionais, capazes de promover a saúde (XU et al, 2017). Compostos bioativos, por sua vez,

são classificados como substâncias com alegações funcionais ou tóxicas, essas substâncias podem estar presentes em diferentes proporções nos vegetais, sementes, frutos, entre outros (HO; RAFI; GHAI, 2010).

A classe dos compostos fenólicos mais importantes que estão presentes nos alimentos são derivados dos flavonoides, taninos e fenilpropanoides. Os taninos podem ser taninos hidrolisáveis ou taninos não hidrolisáveis, esses podem ser formados por glicose e ácido gálico em diferentes conformações (NUNES; BESTEN, 2016).

Diversas pesquisas têm indicado que o tegumento externo do pinhão (*Arauraria angustifolia*) é rico em compostos fenólicos e em atividade antioxidante, esse subproduto normalmente é descartado após o cozimento e separação da amêndoa (CORDENUNSI et al., 2004; FREITAS et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Dentre os compostos fenólicos encontrados nos extratos de pinhão, estão as proantocianidinas, derivadas das catequinas e epicatequinas, o flavonol quercetina-3-glicosídeo, a flavanona eriodictiol hexosídeo e dois ácidos fenólicos sendo estes derivados dos ácidos protocatecuico e ferúlico (FREITAS et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

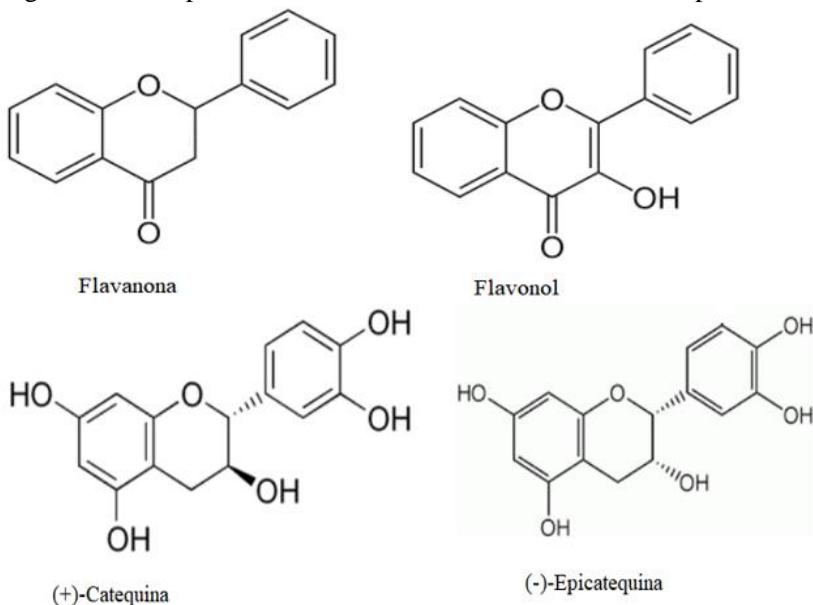
1.6 FLAVONOIDES

Os flavonoides são um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e amplamente distribuídos nas plantas. Existe uma vasta variedade de flavonoides, cerca de mais de 2000 são de origem natural (HO; RAFI; GHAI, 2010). Sua estrutura principal contém 15 átomos de carbono organizados em três anéis, sendo esses dois anéis benzênicos e um anel pirânico (NUNES; BESTEN, 2016).

Os compostos flavonoides apresentam uma gama de padrões de substituição como a hidroxilação, metoxilação, metilação e glicosilação que proporcionam diversidade e complexidade aos mesmos. A glicosilação, por exemplo, tem a capacidade de alterar a solubilidade da água e a estabilidade dos flavonoides. Grande parte dos flavonoides apresentam ação antioxidante, além de serem considerados importantes compostos antimicrobianos (YANG et al., 2018).

Segundo Santos e colaboradores (2018), os flavonoides representam a maior proporção de compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcolóico (etanol/água) do pinhão, correspondendo a aproximadamente 89-92% da constituição total, dentre esses os mais abundantes são a catequina e a epicatequina, as flavononas e o flavanol (Figura 7).

Figura 7 - Principais flavonoides encontrados nos extratos do pinhão.



Fonte: Adaptado e modificada de Nunes e Besten (2016).

1.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Muitos compostos fitoquímicos presentes nas plantas apresentam propriedades benéficas a saúde. Entre os mecanismos associados a esses benefícios está a ação antioxidante, realizada por esses compostos, como o sequestro de radicais livres, manutenção da integridade estrutural das moléculas e das células, protegendo, assim, o organismo contra danos no DNA, estresse oxidativo, e conseqüentemente envelhecimento precoce (HO; RAFI; GHAI, 2010).

Dentre os grupos que apresentam considerável ação antioxidante, estão os compostos fenólicos. Segundo a *World Cancer Research Fund* (2018), a ingestão diária de alimentos que apresentem esses compostos está associada ao aumento da longevidade, e à redução na incidência de doenças crônicas não transmissíveis e câncer.

Os estudos com o pinhão cozido e cru e de outras partes da *Araucaria angustifolia*, como folhas e cascas da sua árvore, confirmam que os mesmos, apresentam significativa atividade antioxidante (CORDENUNSI et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2009; SILVA et al., 2014; FREITAS et al, 2018; SANTOS et al., 2018).

Yamaguchi e colaboradores (2009), estudaram o potencial antioxidante protetor dos extratos das folhas da *Araucaria angustifolia* frente aos danos induzidos pelos raios UV sobre o DNA de timo de bezerro, constataram que a fração flavonoide protegeu o DNA dos danos causados pelos raios UV, através da diminuição da oxidação dos nucleotídeos e dos dímeros de pirimidina.

Souza et al. (2014), estudaram as brácteas do pinhão comum, também afirmaram que essas são ricas em compostos naturais com atividade antioxidante, apresentam importante efeito protetor contra o dano oxidativo de lipídeos, proteínas e DNA em fibroblastos de pulmão humano. Sua atividade antioxidante está correlacionada a presença de compostos como: catequina, epicatequina, quercetina e apigenina, capazes de atuarem na inibição do mecanismo oxidativo associado a doenças degenerativas (SOUZA et al. 2014).

1.8 COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS

Apesar dos compostos fenólicos apresentarem comprovação científica de seus benefícios, alguns desses compostos quando em excesso podem apresentar atividade antinutricional, impedindo a absorção de diversos nutrientes e moléculas importantes ao organismo. Os taninos, por exemplo, por apresentarem a capacidade de se ligar à macromoléculas como as proteínas e os polissacarídeos; e aos íons metálicos como cálcio, ferro entre outros, podem causar a redução da biodisponibilidade e da digestibilidade no organismo (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os taninos são comumente classificados como taninos condensados ou hidrolisados. Os taninos condensados ou proantocianidinas, apresentam duas unidades derivadas das catequinas, já os taninos hidrolisados resultam da esterificação dos glicídios com unidades de ácido gálico (OLIVEIRA et al., 2015; DEMARQUE et al., 2018).

A *Araucaria angustifolia* é rica em proantocianidinas, fator que deve ser levado em consideração, uma vez que esses compostos são capazes de inibir fortemente a α -amilase, resultando em um atraso na digestão dos glicídios. As proantocianidinas da araucaria também apresentaram efeito sobre a lipase pancreática (SILVA et al. 2014, OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2018). Estas funções podem ser analisadas em diferentes ângulos, quando se trata de definir potenciais aplicações.

1.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O aumento da vida útil do alimento é alcançado através da redução da carga microbiológica, utilizando processamento e métodos de conservação adequados (AUGUSTO; SOARES; CASTANHA, 2018). Dentre os métodos de conservação utilizados está o emprego de compostos sintéticos ou naturais que apresentam atividade antimicrobiana (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

A aplicação de compostos naturais como agentes antimicrobianos vem aumentando gradativamente, uma vez que, essas substâncias têm ganhado maior importância frente aos compostos sintéticos. Isso se deve a dois principais fatores como, o crescente aumento de cepas resistentes relacionadas ao uso indevido ou incorreto dos antibióticos, dentre eles os micro-organismos patogênicos transmitidos através dos alimentos, que além de serem resistentes aos compostos sintéticos utilizados, apresentam maior tolerância ao processamento, e os riscos ambientais estão correlacionados com o uso indevido (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Dentre os compostos naturais associados a atividade antimicrobiana estão os metabólitos secundários das plantas. Mbaveng et al. (2015) constataram a atividade antimicrobiana de dezenove compostos naturais dentre eles terpenoides, alcaloides, tiofenos e fenólicos frente a 14 cepas diferentes, sendo elas sensíveis e resistentes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. stuartii*. Desses compostos os que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram os compostos fenólicos (flavonoides, isoflavonoides, benzofenona, benzofurano, cumarinas, ácido elágico e lignana).

A investigação destes compostos no pinhão, bem como os efeitos antimicrobianos dos extratos podem indicar possíveis aplicações para as águas do cozimento.

1.10 BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE

A biodisponibilidade está diretamente relacionada com a bioacessibilidade da matriz alimentar durante a digestão. Através da bioacessibilidade é possível determinar a quantidade do composto de interesse que é liberado, e está disponível para a absorção durante o processo gastrointestinal. A bioacessibilidade pode ser avaliada *in vitro*, por intermédio de uma digestão gastrointestinal simulada, por membrana artificial, cultura celular, cultura Caco-2 (linhagens celulares provenientes do epitélio do colórectal humano), entre outros métodos (BARBA et al. 2017; GALANAKIS, 2018). As informações referentes a

bioacessibilidade são valiosas para determinar a dosagem e garantir a eficiência nutricional dos alimentos (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; CARBONELL-CAPELLA et al., 2015).

A biodisponibilidade por sua vez, faz parte de um processo mais complexo, correspondendo não apenas a quantidade de compostos liberados prontos para a absorção, mas também inclui processos metabólicos, pré-disposição genética, distribuição do nutriente no organismo e bioatividade, podendo variar de indivíduo para indivíduo (HOLST; WILLIANSO, 2008; FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; GRANATO; NUNES; BARBA, 2017).

A ação dos compostos bioativos presentes nos alimentos no organismo não depende apenas da natureza físico-química destes, mas também da sua bioacessibilidade e biodisponibilidade perante as barreiras biológicas, tornando disponível o composto alvo para utilização pelos órgãos e tecidos, visando exercer determinadas funções fisiológicas (ALMINGER et al., 2014; CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; BARBA et al., 2017). Parâmetros como tratamento térmico, formas de acondicionamento, e processos tecnológicos podem influenciar na bioacessibilidade dos alimentos (BARBA et al., 2017; DEY et al. 2019).

1.11 PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Os consumidores estão cada vez mais conscientes dos problemas de saúde relacionados com a dieta, exigindo ingredientes naturais que sejam seguros e promotores da saúde, como os alimentos funcionais. Subprodutos do processamento de alimentos vegetais representam um grande problema de descarte para a indústria em questão, mas eles também são fontes promissoras de compostos que podem ser usados por causa de suas propriedades tecnológicas ou nutricionais favoráveis (SCHIEBER et al., 2001). Gusman et al. (2001), Delmas et al. (2005), Beer et al. (2003) e Cantos et al. (2002) reportaram efeitos biológicos promotores da saúde relacionados aos compostos fenólicos da dieta, como atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica em estudos epidemiológicos clínicos e *in vitro*.

Os polifenóis podem sofrer modificações iniciais induzidas pelo ácido gástrico do estômago durante o processo de absorção. No intestino delgado, os polifenóis glicosídicos são clivados para liberar o radical glicosídeo antes da absorção. Este processo é mediado por enzimas, que têm afinidade por glicose, xilose e galactose, como lactase florizina

hidrolase (LPH) e β -glicosidase citosólica (β -CBG) (DEL RIO et al., 2013). No entanto, os polifenóis resistentes à ação dessas enzimas não são absorvidos no intestino delgado e podem ser clivados pelas bactérias intestinais para produzir pequenas moléculas como os ácidos fenólicos. As estruturas dos polifenóis ainda podem passar por reações de conjugação com adição de grupos metil, glucuronídeo ou sulfato. Os polifenóis remanescentes, principalmente aqueles ligados à ramnose, são modificados para α -ramnosidases produzidas pela microbiota intestinal (MINATEL et al., 2017). Após estes processos absorptivos, os compostos fenólicos podem ser absorvidos pela mucosa do intestino / cólon, passar pela veia porta e chegar ao fígado, além de poderem ser conjugados no fígado com grupos metil, glicuronídeo ou sulfato e liberados na corrente sanguínea para absorção dos tecidos (MINATEL et al., 2017). Além disso, alguns compostos fenólicos podem exercer efeito prebiótico sobre bactérias benéficas no intestino, estimulando seletivamente o seu crescimento com consequente efeito funcional sobre a saúde do indivíduo (GIBSON et al., 2017).

Nos países em desenvolvimento, os vegetais desempenham um papel relevante no tratamento dos estágios iniciais de várias doenças, devido aos recursos limitados e ao acesso restrito aos tratamentos modernos. Existe também uma demanda em países desenvolvidos industrialmente por abordagens alternativas baseadas em compostos vegetais, o que é motivado pelos efeitos colaterais associados ao uso de medicamentos (CORREIA et al., 2012). Vários extratos vegetais e seus compostos bioativos provaram ser eficazes contra importantes enfermidades de diferentes maneiras, por exemplo, efeito regulador da hiperglicemia e efeito antioxidante entre outros (CHEPLICK et al., 2010; RANILLA et al., 2010; GENOVESE et al., 2008; HOFFMANN-RIBANI et al., 2009). Portanto, há um interesse crescente em investigar a funcionalidade biológica ligada aos compostos bioativos presentes em matrizes vegetais, principalmente em resíduos industriais (CORREIA et al., 2012).

Sem dúvida, os alimentos funcionais representam uma parte importante, inovadora e em rápido crescimento do mercado global de alimentos. Contudo, a matriz complexa dos resíduos e a sua composição de princípios bioativos, requerem uma avaliação cuidadosa dos riscos potenciais que podem surgir de compostos isolados recuperados de subprodutos. Além disso, investigações sobre estabilidade e interações de fitoquímicos com outros ingredientes alimentares durante o processamento e armazenamento também precisam ser iniciadas (SCHIEBER et al., 2001).

REFERÊNCIAS

ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; GOMES, S. N, E. A.; KARAKAYA, M. C.; MARTÍNEZ-CUESTA; McDOUGALL, G. J.; REQUEMA, T.; SANTOS, C. N. *In Vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.13, p. 413-436, 2014.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F.; BONA, C. Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba, PR. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 44-52, 2006.

AUGUSTO, P. E. D.; SOARES, B. M.C.; CASTANHA, N. - Conventional Technologies of Food Preservation. In: BARBA, F. J.; SANT'ANA, A. S.; ORLIEN, V.; KOUBAA, M. **Innovative Technologies for Food Preservation Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms**. 1. ed. Cambridge: Academic Press, 2018. Cap. 1, p. 3-23.

BARBA, F. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**. v.67, p.195-206, 2017.

BEER, D.; JOUBERT, E., GELDERBLOM, W. C., MANLEY, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 902-909, 2003.

CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5691-5696, 2002.

CARBONELL-CAPELLA, J.M.; BUNIEWSKA, M.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. Effect of Stevia rebaudiana addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. **Food Chemistry**, v.184, p.122-130, 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiros**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA – CNPF; Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 640 p.

CHEPLICK, S.; KWON, Y.; BHOWMIK, P.; SHETTY, K. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension.

Bioresource Technology, v.101, pp.404–413, 2010.

CORDENUNSI, B. R.; MENEZES, E. W. de; GENOVESE, M. I.; COLLI, C.; SOUZA, A. G. de; LAJOLO, F.M. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.52, n.11, p.3412-3416, 2004.

CORREIA, R. T.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues.

Food Science and Technology International, v.18, n.6, pp.539–547, 2012.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, pp.1818–1892, 2013.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 377-395, 2005.

DEMARQUE, D. P.; CALLEJON, D.; OLIVEIRA, G. G. DE; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A. LOPES, N. P. The role of tannins as antiulcer agents: a fluorescence-imaging based study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 4, p. 425-432, 2018.

DEY, T. K.; KOLEY, H.; GHOSH, M.; DEY, S.; DHAR, P. Efeitos do nano-dimensionamento na bioacessibilidade lipídica na biodisponibilidade *ex vivo* do óleo rico em EPA-DHA em nanoemulsão aquosa. **Food Chemistry**. v.275, p.135-142, 2019.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**. v.29, n.11, p.751-760, 2009.

FREITAS, T. B. de ; SANTOS, C. H. K.; SILVA, M. V. da ; SHIRAI, M. A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, D. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; VITÓRIALEIMANN, F. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 28-34, 2018.

FRITH, A.C. El pino Paraná (*Araucaria angustifolia*) en Argentina. **IFLAIC**, v. 22, p. 3-17, 1966.

GALANAKIS, C. What is the Difference Between Bioavailability Bioaccessibility and Bioactivity of Food Components?. **Science & Nutrition**. Elsevier Scitech Connect. Disponível em: <<http://scitechconnect.elsevier.com/bioavailability-bioaccessibility-bioactivity-food-components>>. Acesso em: 5 de novembro de 2018.

GENOVESE, M.; PINTO, M.; GONÇALVES, A.; LAJOLO, F. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v.14, pp.207–214, 2008.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GRANATO, D. Determinação de compostos fenólicos majoritários em alimentos e extratos vegetais: Orto-difenólicos, flavonoides totais, antocianinas, proantocianidinas e flavonóis totais. In: GRANATO, D.; NUNES, D. S. **Análise química, propriedades funcionais e controle de qualidade de alimentos e bebidas: uma abordagem teórico-prática**. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap.8, p.193-221.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science & Technology**. v.62, p.13-22, 2017.

GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. A reapraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food control**, v. 46, p.412-429, 2014.

HO, C.; RAFI, M. M.; GHAI, G. Substâncias bioativas: Nutracêuticas e tóxicas. DAMODARAN, S. In: PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artimed, 2010. Cap.12, p.585-608.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, pp.263–268, 2009.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**. v.19, n.2, p.73-82, 2008.

HUECK, K. **Florestas da América do Sul**. Ecologia, composição e importância econômica. Editora da Universidade de Brasília. São Paulo, SP: Polígono S.A., 1972.

IBGE - Produção da extração vegetal e da silvicultura 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?id=774&view=detalhes>. Acesso em: 5 ago. 2018.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil**. 3a. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000, 370 p.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; DOS REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasil. Bot.**, v..27, n.4, p.787-796, out.-dez. 2004.

MATTOS, J. R. de; **O pinheiro Brasileiro**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2011. 700p.

MBAVENG, A. T.; SANDJO, L. P.; TANKEO, S. B.; NDIFOR, A. R.; PANTALEON, A.; NAGDJUI, B. T.; KUETE, V. Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. **Springerplus**, v. 4, p. 1-9, 2015.

MINATEL, I. O.; BORGES, C. V.; FERREIRA, M. I.; GOMEZ, H. A.; CHEN, C.-Y. O.; LIMA, G. P. P. Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. In SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS,

M. R. (EDS.). **Phenolic Compounds - Biological Activity**, Intechopen Ed., 2017.

NUNES, D. S.; BESTEN, M. A. Análise qualitativa de metabólitos secundários de vegetais. In: GRANATO, D.; NUNES, D. S. **Análise química, propriedades funcionais e controle de qualidade de alimentos e bebidas**: uma abordagem teórico-prática. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Cap.1, p.1-26.

OLIVEIRA, R. F.; GONÇALVES, G. A.; INÁCIO, F. D.; KOEHNLEIN, E. A.; SOUZA C. G. de; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Inhibition of pancreatic lipase and triacylglycerol intestinal absorption by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Nutrients**, v.9, n.7, p. 5501-5614, 2015.

ORELLANA, E.; VANCLAY, J. K. Could native Araucaria forests be managed for timber production on small farms in southern Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 430, p. 1-9, 2018.

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

RANILLA, L.; KWON, Y.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v.101, pp.4676–4689, 2010.

REITZ, P. R.; KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense**. Parte I, Fascículo: As Plantas Araucariáceas, Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues Santa Catarina, Brasil, 1966. 62p.

REITZ, R. & KLEIN, R. M. **Madeiras do Brasil**: Santa Catarina. Florianópolis: Editora Lunardelli, 1979. 320 p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e de Abastecimento - SUDESUL, 1988. 528 p.

REZENDE, C. S. **Valorização da casca do pinhão, um subproduto da semente de *Araucaria angustifolia*, para produção de materiais poliméricos**. Bragança, Portugal: IPB, 2016. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado em Qualidade e Segurança de Alimentos, Universidade Politécnica de Bragança – Escola Superior Agrária, 2016.

SANTOS, C. H. K. ; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; ISABEL C.F.R. FERREIRA; GONÇALVES, O. H. ; BONA, E. ; SILVA, M. V. DA; LEIMANN, F. V. Systematic study on the extraction of antioxidants from *pinhão* (*Araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 216-223, 2018.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v.12, n.11, pp. 401-413, 2001.

SEITZ, R. Crown development of *Araucaria angustifolia* in its natural environment during sixty years. In: **Crown and canopy structure in relation to productivity**. Proceedings. Ibaraki, Forestry and Forest Products Research Institute: JAPAN. 1986, p. 129-146.

SILVA, S. M. DA; KOEHNLEIN, E. A.; BRACHT, A.; CASTOLDI, R.; DE MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; PERALTA, R. A.; DE SOUZA, C. G. M.; DE SÁ-NAKANISHI, A. B.; PERALTA, R. M. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.

SOARES, T. S.; MOTA, J. H. Araucaria - O pinheiro brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Floretal**. Ano II, nº 3, 2004.

SOUZA, M. O.; BRANCO, C. S.; SENE, J.; AGNOL, R. D.; AGOSTINI, F.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, **Antioxidants (Basel)**, v. 3, p.24-37, 2014.

SOUZA, V.C. **Gimnospermas in Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB128477>>. Acesso em 24 junho de. 2017.

WENDLING, I.; ZANETTE, F. **Araucária particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa Florestas: Colombo – PR, 2017. 163p.

WORLD CANCER RESEARCH FUND - Cancer Prevention Recommendations (2018). Disponível em:

<https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-prevention-recommendations>. Acesso em: 10 jul. 2018.

WREGGE, M. S.; SOUSA, V. A.; FRITZSONS, E.; SOARES, M. T. S.; AGUIAR, A.V. Predicting Current and Future geographical distribution of *Araucaria* niche modeling. **Environmental and Ecology Research**, v. 4, p. 269-279, 2016.

XU, C. , WANG, B. ; PU , Y. ; TAO, J. ; ZHANG, T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.15, p.721-731, 2017.

YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; MASCIO, P. D. Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. **Phytochemistry**, v.70, n.5, p. 615-620, 2009.

YANG, B.; LIU, H.; YANG, J.; GUPTA, V. K.; JIANG, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p.116-124, 2018.

ZECHINI, A. A.; SCHUSSLER, G.; SILVA, J. Z.; MATTOS, A. G.; PERONI, N.; MANTOVANI, A. REIS, M. S. dos. Produção, comercialização e Identificação de variedades de pinhão no entorno da floresta nacional de Três Barras – SC. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 74-82, 2012.

CAPÍTULO 2

ÁGUAS DO COZIMENTO DE DUAS VARIEDADES DE PINHÃO (*ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) OTTO KUNTZE): AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS

Artigo submetido à revista **LWT – Food Science and Technology**
(ISSN: 0023-6438)

O comprovante está apresentado no Anexo A.

Águas do cozimento de duas variedades de pinhão (*Araucaria angustifolia* (bert.) otto kuntze): avaliação comparativa da composição fenólica e atividades antioxidantes e antimicrobianas

RESUMO

As sementes da Araucária representam importante produto da mata atlântica, as amêndoas são consumidas, enquanto cascas e águas de cozimento representam resíduos ainda não valorizados. Neste trabalho foram estudadas as águas do cozimento do pinhão em diferentes tempos, com e sem cloreto de sódio e, foi comprovado a presença de compostos fenólicos, atividade antioxidante e, portanto, poderiam ser estudadas para o consumo humano. O cozimento por 45 minutos sem sal resultou em um maior teor de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante (DPPH e FRAP), tanto para o pinhão comum quanto para o pinhão macaco. As águas de cozimento em nenhuma das condições testadas apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas. A determinação dos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS, identificou e quantificou o ácido protocatecuico, a vanilina e coniferaldeído. Os maiores tempos de cozimento com e sem sal resultaram em maior extração de compostos fenólicos, no entanto as extrações sem sal foram mais eficientes e resultaram em extratos com maior atividade antioxidante.

Palavras-chave: HPLC-ESI-MS/MS; Compostos fenólicos; Resíduos; *Araucaria angustifolia*

Cooking water of seeds from two varieties of *Araucaria angustifolia* (bert.) Otto kuntze): comparative evaluation of phenolic composition antioxidant and antimicrobial activities.

ABSTRACT

Araucaria seeds (*pinhão*) represent an important product of Atlantic forest, while almonds are consumed, bark and water represent waste not yet valued. In this work, the waters of the *pinhão* cooking were studied at different times, with and without sodium chloride, and the presence of phenolic compounds, antioxidant activity and could be studied for human consumption. Cooking for 45 minutes without salt resulted in a higher content of phenolic compounds and higher antioxidant activity (DPPH and FRAP), both for the common *pinhão* and for the monkey *pinhão*. Cooking waters under none of the conditions tested showed antimicrobial activity against *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Protocatechuic acid, vanillin and coniferaldehyde were identified and quantified by HPLC-ESI-MS / MS. Highest cooking time with and without salt, resulted in major phenolic compounds extraction. Meanwhile extractions without salt were more efficient and resulted in extracts with higher antioxidant activity.

Keywords: HPLC-ESI-MS/MS. Physicochemical composition. Antimicrobial activity. Residue.

1. INTRODUÇÃO

O pinheiro do Paraná é uma árvore amplamente encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil, ocorrendo em diferentes variedades, entre elas, *Araucaria angustifolia* var. *angustifolia* e *Araucaria angustifolia* var. *indehiscens*, conhecidos popularmente como pinhão “comum” e pinhão “macaco”, respectivamente (LIMA et al., 2007). Essas sementes são utilizadas tanto pela população (de forma doméstica) quanto pelas indústrias para o consumo, por cocção em água. Entretanto, a água de cocção geralmente é descartada, apresentando tonalidade marrom avermelhada, sabor amargo, o que denota a provável presença de compostos fenólicos, devido à migração que ocorre, principalmente das cascas das sementes para água (KOEHNLEIN et al., 2012).

Diversos estudos têm mostrado que o pinhão pode apresentar atividade antioxidante devido à presença de compostos fenólicos (SANTOS et al., 2018), os quais estão associados com efeitos protetores contra várias doenças, mais especificamente devido a água residual da cocção do pinhão apresentar fenólicos bioacessíveis (CUNHA et al., 2018). Entretanto, é necessário compreender quais compostos fenólicos específicos são encontrados na água de cocção utilizando técnicas cromatográficas, como por exemplo, cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, uma vez que na literatura apenas é reportada a determinação de compostos fenólicos totais. Além das propriedades antioxidantes que a água de pinhão pode apresentar, faz-se necessário investigar a ação antimicrobiana a fim de se estabelecer e potencializar para quais aplicações industriais essa água de cocção pode ser destinada.

Ao identificar perspectivas de propriedades funcionais nas cascas e nas águas de cozimento, surgem novas oportunidades, além de efetivamente contribuir para justificar a preservação dos pinheiros. Ao mesmo tempo, justifica-se investigar a composição das águas residuais do cozimento, obtidas tanto em escala industrial, quanto em residências, restaurantes comerciais ou institucionais e agroindústrias, com proposta de agregar valor comercial e, concomitantemente, proporcionar avanços socioeconômicos gerando menor desperdício ou problemas ambientais devido ao seu descarte. No entanto, até o momento, as águas de cozimento não foram estudadas com o propósito de justificar a sua aplicação.

Diante do exposto, este trabalho objetivou investigar a composição fenólica e atividades antioxidantes e antimicrobianas das águas de cocção do pinhão *Araucaria angustifolia* var. *angustifolia* e *Araucaria angustifolia* var. *indehiscens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras foram adquiridas na cidade de São José do Cerrito – SC, latitude: 27° 39' 45" Sul, longitude: 50° 34' 48" Oeste, onde o pinhão comum foi coletado entre os meses de junho e julho/2018 e o pinhão macaco no mês de agosto/2018 sendo armazenados em freezer -20 ± 2 °C (modelo FE 22 Super, Eletrolux[®], Curitiba, Brasil) até a realização das análises.

2.2 Reagentes

Os reagentes Folin-Ciocalteu, ácido gálico, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,2'-2,4,6-tripiridiltriazina), Trolox, e padrões fenólicos ultra-puros foram obtidos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os padrões (n=44) foram preparados com uma solução estoque (1000 mg L^{-1} em 100 % metanol grau HPLC) e armazenados em freezer e usados para preparar a curva de calibração por diluição apropriada da mistura. Todos os demais reagentes químicos e solventes utilizados foram de grau analítico.

2.3 Preparo da amostra

Para o preparo das águas foram utilizados 100 g de amostra tanto para o pinhão comum quanto para o pinhão macaco armazenados em freezer, onde foram cozidos em 1000 mL de água destilada, em diferentes tempos (15, 30 e 45 minutos – tempos contabilizados a partir do momento em que a panela atingiu a pressão máxima) com e sem cloreto de sódio (Cisne Tradicional) todas em triplicata em panela de pressão de 4,5 L (Clock[®], São Bernardo do Campo, Brasil). Para as amostras com sal foram utilizados 15 g de NaCl valor adaptado de David e Silochi (2010). Após o cozimento mediu-se o volume final da água e acondicionaram-se as mesmas em tubos Falcon que foram armazenados em freezer a -20 ± 2 °C (modelo FE 22 Super, Eletrolux[®], Curitiba, Brasil) até o momento das análises.

2.4 Determinação de pH, sólidos solúveis totais, cinzas, proteínas solúveis e colorimetria

As análises físico-químicas foram realizadas como proposto pela AOAC (2005). Teor de sólidos solúveis totais foi determinado em refratômetro de Abbe (modelo tropen, Carl Zeiss, Jena, Alemanha),

calibrado com água destilada; cinzas em forno mufla (FORNITEC, modelo 2017, São Paulo, Brasil) a 550 °C, com incineração prévia e proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976). Para determinação de pH foi utilizado potenciômetro (MP220, Metler-Toledo, Greinfensee, Switzerland). Parâmetros CIELab (L^* , a^* e b^*) foram determinados usando um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-400, Osaka, Japão), ajustado para operar com iluminante D65 e ângulo de observação de 2°, previamente calibrado. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Frutas e Hortaliças, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.5 Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor dos compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado como proposto por Singleton e Rossi (1965) com modificações feitas por Arriola et al. (2014). Esta análise foi realizada no Laboratório de Frutas e Hortaliças, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. Resumidamente, 1 mL de cada amostra foi adicionada com reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v), a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso durante 5 minutos e, em seguida, foram adicionados 4 mL de solução de Na_2CO_3 (7,5 g 100 mL⁻¹). Após 2 horas, a absorbância da solução foi avaliada a 765 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão). A curva de calibração foi construída utilizando o ácido gálico e o teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mL de amostra (EAG 100 mL⁻¹).

2.6 Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada como proposto por Brand-Williams et al. (1995), com modificações feitas por Arriola et al. (2014). Aliquotas de 0,1 mL de cada amostra foi adicionada a 2,9 mL de solução de DPPH (0,039 g L⁻¹). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida ao abrigo da luz durante 30 minutos. A absorbância da solução resultante foi medida à 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão). A curva de calibração foi construída utilizando soluções contendo concentrações conhecidas de Trolox. Os resultados foram expressos em micromol de Trolox por 100 mL de amostra ($\mu\text{Mtrolox}$ 100 mL⁻¹).

O poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi determinado como proposto por Benzie e Strain (1996), com modificações de Arriola et al. (2014). Resumidamente, 100 μL de cada amostra foram adicionados

a 100 μL de FeCl_3 (3 mmol L^{-1} em 5 mmol L^{-1} de ácido cítrico) e incubados a 37 ± 2 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Após a incubação, foi adicionada uma solução contendo 1,8 mL de 2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazina (TPTZ) 1 mmol L^{-1} em HCl 50 mmol L^{-1} , mais 300 mmol L^{-1} de tampão acetato (pH 3,6) e, após 10 minutos, a absorbância da solução resultante foi medida espectrofotometricamente a 593 nm (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão). A curva de calibração foi construída utilizando soluções contendo concentrações conhecidas de Trolox. Os resultados foram expressos em micromol de Trolox por 100 mL de amostra ($\mu\text{Mtrolox}$ 100 mL^{-1}).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Frutas e Hortalças, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.7 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

2.7.1 Preparo das amostras

A extração dos compostos fenólicos seguiu a metodologia proposta por Schulz et al. (2015) com modificações. Os compostos fenólicos presentes nas águas de cozimento do pinhão macaco e comum foram extraídos utilizando 10 mL de amostra a qual foi transferida para tubo Falcon ajustando o pH da amostra com HCl 6 mol L^{-1} e NaOH 6 mol L^{-1} até atingir pH 2. Em seguida, as amostras foram submetidas a extração por partição com éter etílico e centrifugada a 4000 rpm (Hermle, Z 200A, Wehingen, Alemanha) por 10 minutos, com a remoção do sobrenadante. O procedimento foi repetido por três vezes, os sobrenadantes foram combinados em um balão de fundo redondo e o solvente foi rotaevaporado a 40 $^\circ\text{C}$ até completa secagem. Os extratos secos das águas de cozimento do pinhão macaco e comum foram recolhidos em 1 mL de metanol e diluídos 10 vezes, para posterior injeção em HPLC-ESI-MS/MS.

2.7.2 Análise HPLC-ESI-MS/MS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha) seguindo metodologia proposto por Schulz et al. (2015). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC), do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina. Os compostos

foram separados em coluna Synergi™ (4.0 µm, 2.0 x 150 mm d.i.; Phenomenex, USA). A fase móvel consistiu de uma solução de metanol 95 ml 100mL⁻¹ e água 5 ml 100mL⁻¹ (A) e de água com ácido fórmico 0,1 ml 100mL⁻¹ (B). A separação foi realizada a 30 °C utilizando eluição por gradiente segmentado de acordo com as seguintes etapas: 0 – 5 min, 10 % A; 5 – 7 min, 90 % A; 7 – 10 min, 90 % A; 10 – 17 min, 10 % A. O fluxo utilizado foi de 250 µl min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL.

O sistema HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas com analisador triploquadrupolo e ion trap linear, modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada). Os experimentos foram realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIonSpray (TurboIonSpray Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord-ON, Canada) em modo negativo. Os parâmetros MS/MS foram: agulha capilar mantida a -4500 V; gás de cortina a 10 psi; temperatura de 400 °C; gás 1 e 2 a 45 psi, e gás de colisão, médio. O software Analyst versão 1.5.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados obtidos.

2.8 Atividade antimicrobiana

2.8.1 Preparo do extrato

As amostras de pinhão macaco (PM) e pinhão comum (PC) foram cozidas, em triplicata, sob pressão por 45 minutos na proporção de pinhão: água de 100g:1000 mL. Após o cozimento, o volume restante médio foi de 340 mL (310 – 345 mL), destas águas de cozimento foram retirados 50 mL e feito um pool, totalizando 150 mL, que foram liofilizados em liofilizador de bancada (Terroni® LS3000D, São Carlos, Brasil),

Os extratos concentrados de PM e PC (EPM e EPC), utilizados neste estudo, correspondiam a concentração de 2,7 mg mL⁻¹ e 4,0 mg mL⁻¹, respectivamente.

2.8.2 Cepas utilizadas

Para a realização do estudo as seguintes cepas foram utilizadas: *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) pertencentes a Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde, doadas pela Fundação Oswaldo Cruz.

2.8.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato da água de cozimento do pinhão (*Araucaria angustifolia*) foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos II, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. O potencial antimicrobiano do extrato foi determinado pelo método de difusão em ágar, por meio de disco de papel e em poços preconizados por National Committee for Clinical Laboratory Standards na norma M2-A8.

2.8.3.1 Preparo dos inóculos

As cepas foram mantidas em ágar tripticase de soja (TSA) a 4°C. A reativação das cepas foi realizada com a transferência para caldo BHI (brain -heart infusion), incubação por 24 horas a 35 °C. Para cada bactéria foi realizado o teste de pureza das colônias, em meios seletivos e diferenciais: *E. coli* em ágar eosina azul de metileno; *B. cereus* em ágar manitol gema de ovo e polimixina; *S. aureus* em ágar Baird Parker e *Salmonella* Typhimurium em ágar xilose, lisina desoxicolato.

As colônias isoladas foram transferidas para caldo BHI seguida de incubação por 24 horas a 35 °C para obtenção do inóculo de estoque. O inóculo de trabalho foi obtido pela transferência de 100 µL de cada cepa de estoque para um tubo com 5 mL de caldo nutriente e incubados por 24 horas a 35 °C, seguido de diluição em água peptonada 0,1g 100 mL⁻¹ para obtenção da concentração de 10⁵ UFC mL⁻¹, equivalente a turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland.

2.8.3.2 Método de difusão em ágar disco

O método de difusão em ágar é um teste simples de suscetibilidade microbiana. No presente estudo foi utilizado ágar Mueller Hinton (MH), semeados na superfície, com o uso do *swab*. Seis discos de papel-filtro foram colocados em cada placa e impregnados com 7 µL dos seguintes compostos: água destilada estéril, ciprofloxacino 0,05%, EPC (4,0 mg mL⁻¹), EPC (2,0 mg mL⁻¹), EPM (2,7 mg mL⁻¹) e EPM (1,4 mg mL⁻¹). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 35 °C. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos, com auxílio de um paquímetro.

2.8.3.3 Método difusão em ágar por poço

O teste difusão por poço foi realizado em duplicata com ágar Mueller-Hinton em placas de Petri inoculadas em profundidade com as

cepas em questão. Com auxílio de molde, foram feitos orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Os poços foram preenchidos com o volume de 30 μL de água destilada estéril, ciprofloxacino 0,05%, EPC (4,0 g mL^{-1}), EPC (2,0 g mL^{-1}), EPM (2,7 g mL^{-1}) e EPM (1,4 g mL^{-1}). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. O resultado do teste consistiu na análise da presença ou ausência de halos de inibição de crescimento microbiano em torno do poço que foram medidos, com auxílio de um paquímetro.

2.9 Microscopia

2.9.1 Microscopia de fluorescência

Foi utilizada a água do pinhão que apresentou o maior CFT tanto para o pinhão macaco, quanto para o pinhão comum. Uma alíquota de amostra foi transferida, para lâminas de vidro, recobertas com lamínula e visualizadas em microscópio de Fluorescência (OLYMPUS® BX4, Tóquio, Japão) empregando auto fluorescência para a identificação da presença dos compostos fenólicos estruturais. Para cada amostra, foram realizadas leituras em triplicata. Esta análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, vinculado ao Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA). Os resultados foram submetidos à análise de variância one-way (ANOVA), seguido do teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises quantitativas foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As águas residuais do cozimento dos pinhões comum e macaco, possuem propriedades importantes para futuras aplicações. Considerando que a prática culinária é o cozimento com sal, foram avaliadas as águas de cozimento do pinhão cozido com e sem sal.

Pode ser observado que o pinhão macaco difere do pinhão comum, quanto ao cozimento com ou sem sal (Tabela 3). O pH do pinhão comum apresenta maior queda do que o pH do pinhão macaco, na presença de sal. No entanto, os extratos se caracterizam como material de baixa acidez,

todos ultrapassam o pH 4,0, sendo o extrato do pinhão comum com sal, 45 minutos, o que apresenta o menor pH (4,66), o que alerta para a estabilidade microbiológica, no caso do aproveitamento do mesmo como um chá, após futuros estudos. Quanto a acidez total titulável, um parâmetro relacionado com a presença de compostos com características de ácido nos extratos, pode ser observado que para as duas variedades, apenas nos menores tempos de cozimento, ocorre diferença na acidez titulável. Porém, como era esperado, os valores são baixos, por representar um extrato de baixa acidez, conforme as determinações do pH. Estas características indicam a presença de ácidos fracos, como os ácidos fenólicos. Lunkes e Hashizume (2014), ao analisarem diferentes chás comercializados no mercado brasileiro, encontraram valores de pH variando de 2,89 a 7,89, para diferentes tipos de chá preto e erva-mate, respectivamente. Enquanto, para a acidez titulável, considerando alguns chás com baixo pH, foram encontrados valores superiores aos deste trabalho. Pelas características do pH e acidez total titulável dos extratos estudados, ele se apresenta como de baixa acidez e com perspectivas à ser estudado para consumo humano.

Os sólidos solúveis totais, conforme previsto, aumentam com a adição do sal no cozimento (Tabela 3). Considerando que o sal pode exercer um efeito extrator sobre os compostos fenólicos, a cor pode ser afetada, além do arraste ou mesmo a fixação de outros compostos na casca, impedindo a liberação para o extrato aquoso – água de cozimento. Comparativamente ao pinhão comum, o pinhão macaco apresentou diferente comportamento quanto à fixação do sal, uma vez que houve menor perda do mesmo como sólidos solúveis totais. O mesmo comportamento ocorreu para os teores de cinzas. No entanto, ambos apresentaram comportamento similar quanto ao teor de cinzas nos diferentes tempos de cozimento com e sem sal.

Fato a ser valorizado está no teor de proteínas solúveis, as quais correspondem às proteínas liberadas para a água durante o cozimento. A presença de sal no cozimento de ambos os pinhões mudou completamente o perfil das águas de cozimento, em especial, do pinhão macaco, comparativamente ao comum. Ocorreu uma fixação da proteína solúvel, provavelmente, nas amêndoas, quando o pinhão foi cozido com sal, comparativamente a ambas as amostras sem sal. Houve uma significativa liberação de proteína solúvel, nos diferentes tempos de cozimento com e sem sal, para o pinhão comum. No entanto, não foi registrada a presença de proteínas solúveis nas águas de cozimento do pinhão macaco com sal a 30 e 45 minutos de cozimento. Este fato explica as proteínas solúveis contribuindo para a fração sólidos solúveis totais, bem como chama a

atenção quanto a possíveis diferenças esperadas na bioacessibilidade dos compostos fenólicos. Em estudos posteriores deve ser investigado o efeito tanante dos compostos fenólicos do pinhão na presença e ausência de sal e as consequências desse fato sobre as propriedades funcionais, ou seja, sua capacidade antioxidante, destes extratos aquosos com e sem sal em diferentes tempos de cozimento para os dois tipos de pinhão.

Tabela 3 - Parâmetros de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, cinzas e proteínas solúveis nas águas de cozimento do pinhão comum e macaco, em diferentes tempos de cozimento, com e sem sal.

Pinhão	Tratamentos	pH	ATT (%)	SST (°BRIX)	Cinzas g 100 mL⁻¹	Proteínas mg 100mL⁻¹
Comum	Sem sal – 15 min	5,61 ± 0,07 ^{aA}	0,18 ± 0,03 ^{aABC}	0,01 ± 0,00 ^{dD}	0,02 ± 0,00 ^{HH}	7,04 ± 1,04 ^{bBC}
	Sem sal – 30 min	5,38 ± 0,03 ^{bAB}	0,21 ± 0,03 ^{aAB}	0,00 ± 0,00 ^{dD}	0,03 ± 0,00 ^{cFG}	9,37 ± 0,88 ^{bB}
	Sem sal – 45 min	5,28 ± 0,02 ^{bBC}	0,21 ± 0,03 ^{aAB}	0,05 ± 0,01 ^{dD}	0,04 ± 0,00 ^{dF}	22,61 ± 2,03 ^{aA}
	Com sal – 15 min	4,99 ± 0,03 ^{cEFG}	0,13 ± 0,08 ^{aABC}	1,25 ± 0,06 ^{cC}	0,08 ± 0,00 ^{cE}	4,15 ± 2,02 ^{cDE}
	Com sal – 30 min	4,79 ± 0,05 ^{dGH}	0,18 ± 0,03 ^{aABC}	2,00 ± 0,06 ^{bB}	0,11 ± 0,00 ^{bC}	6,48 ± 2,96 ^{bB}
	Com sal – 45 min	4,66 ± 0,10 ^{dH}	0,20 ± 0,00 ^{aAB}	2,90 ± 0,46 ^{aA}	0,14 ± 0,00 ^{aA}	7,46 ± 1,33 ^{bB}
Macaco	Sem sal – 15 min	5,62 ± 0,21 ^{aA}	0,13 ± 0,03 ^{bcABC}	0,10 ± 0,01 ^{Ed}	0,01 ± 0,00 ^{HH}	0,49 ± 0,28 ^{cE}
	Sem sal – 30 min	5,11 ± 0,05 ^{bcCEF}	0,16 ± 0,06 ^{abcABC}	0,00 ± 0,00 ^{dD}	0,03 ± 0,00 ^{cG}	3,45 ± 0,08 ^{bCDE}
	Sem sal – 45 min	4,93 ± 0,06 ^{cFG}	0,23 ± 0,03 ^{aA}	0,19 ± 0,01 ^{cD}	0,04 ± 0,00 ^{dF}	6,41 ± 0,16 ^{aBCD}
	Com sal – 15 min	5,22 ± 0,03 ^{bBCE}	0,08 ± 0,08 ^{cC}	0,30 ± 0,01 ^{abD}	0,08 ± 0,00 ^{cE}	0,49 ± 0,28 ^{cE}
	Com sal – 30 min	5,20 ± 0,08 ^{bcBCE}	0,12 ± 0,03 ^{bcBC}	0,29 ± 0,0 ^{bD}	0,10 ± 0,00 ^{bD}	0,00 ± 0,00 ^{cE}
	Com sal – 45 min	5,20 ± 0,06 ^{bcBCE}	0,18 ± 0,03 ^{abABC}	0,36 ± 0,05 ^{aD}	0,13 ± 0,00 ^{aB}	0,00 ± 0,00 ^{cE}

ATT: Acidez Total Titulável; SST: Sólidos Solúveis Totais. Dados representados com valor das médias de cada amostra ± desvio padrão (n=6). ^{a-f}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma variedade do pinhão indica diferença significativa (p < 0,05) entre tratamentos aplicados. ^{A-H}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa (p < 0,05) entre os tratamentos aplicados e variedades do pinhão concomitantemente.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O pinhão macaco apresentou comportamento distinto do pinhão comum de acordo com o tempo de cozimento e adição de sal quanto ao parâmetro L^* (Tabela 4). Já quanto aos parâmetros a^* e b^* , as águas de cozimento tendem a ficar mais avermelhadas com a adição de sal e com o tempo de cozimento, o que pode indicar um maior carreamento de compostos fenólicos. Ambos apresentaram maiores valores para o parâmetro b^* sem a adição de sal, com 45 minutos de cozimento (Tabela 4).

A partir da imagem de microscopia de fluorescência das águas do pinhão macaco (Figura 8a) e comum (Figura 8b) foi possível confirmar a presença dos compostos fenólicos nos quais são encontrados em todo líquido podendo apresentar aglomerados. Quanto maior a intensidade de cor, maior o teor de compostos fenólico. A autofluorescência indica a presença de compostos fenólicos e lignina (composto fenólico estrutural). A variação de cor entre as cores vermelha, marrom e alaranjada indica a maior concentração de compostos fenólicos e a cor azul brilhante indica a presença de ligninas.

Considerando estes resultados, as amostras das águas de cozimento dos pinhões comum e macaco com e sem sal em diferentes tempos, tiveram os compostos fenólicos totais quantificados (Tabela 5). O cozimento sem sal, para os dois pinhões apresentou o maior teor de compostos fenólicos para ambas as amostras, no entanto, o pinhão comum apresenta valor significativamente superior ao pinhão macaco, no mesmo tempo de cozimento, sem sal. Neste mesmo tempo de cozimento, 45 minutos, sem sal, as amostras apresentaram os maiores valores para a atividade antioxidante avaliada por DPPH e por FRAP (Tabela 5). Estes resultados chamam a atenção para futura valorização das águas do cozimento do pinhão, uma vez que a adição do sal parece fixar compostos fenólicos nas sementes. No entanto, ao observar a atividade antioxidante, observa-se a resposta dos diferentes tipos de compostos antioxidantes liberados nos diferentes tratamentos, para os dois tipos de pinhão. As propriedades funcionais do extrato aquoso de um dos chás mais consumido no mundo *Camelia sinensis* (sob diferentes formas de processamento), são atribuídas à presença de compostos fenólicos (AL-OBAIDI et al., 2015; SHANNON et al., 2018), embora os chás estudados tenham sido avaliados ou na concentração de consumo ou em base peso seco, a presença de compostos fenólicos no extrato aquoso dos pinhões comum e macaco, pode ser importante para futuros estudos sobre as propriedades funcionais destas águas de cozimento.

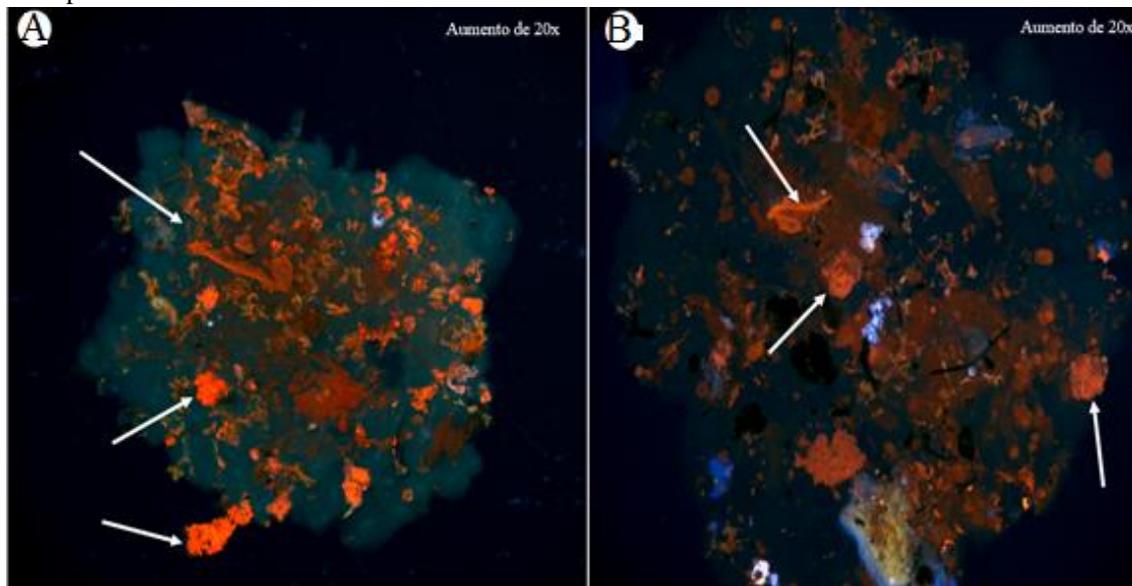
Tabela 4 - Avaliação dos parâmetros de cor L*, a* e b* frente ao tempo de cozimento da água de cozimento do pinhão comum e macaco com e sem sal.

Pinhão	Tratamentos	Parâmetros CIElab		
		L*	a*	b*
Comum	Sem sal – 15 min	50,82 ± 0,56 ^{aAB}	2,07 ± 0,29 ^{dDE}	14,85 ± 0,99 ^{dEF}
	Sem sal – 30 min	48,55 ± 0,76 ^{bBCD}	3,45 ± 0,38 ^{cCD}	18,41 ± 0,63 ^{cD}
	Sem sal – 45 min	41,01 ± 41,01 ^{cE}	10,21 ± 1,51 ^{acA}	25,9 ± 40,96 ^{aA}
	Com sal – 15 min	51,95 ± 1,03 ^{aA}	1,17 ± 0,50 ^{dEF}	13,42 ± 1,80 ^{dF}
	Com sal – 30 min	46,96 ± 1,76 ^{bABC}	3,61 ± 1,02 ^{cCD}	19,61 ± 1,64 ^{bcCD}
	Com sal – 45 min	40,34 ± 1,53 ^{cCD}	7,00 ± 0,66 ^{bB}	21,05 ± 0,62 ^{bBC}
Macaco	Sem sal – 15 min	52,07 ± 1,13 ^{aABCD}	1,66 ± 0,64 ^{cdE}	14,13 ± 1,67 ^{cEF}
	Sem sal – 30 min	48,19 ± 2,50 ^{aABCD}	4,41 ± 1,55 ^{bc}	21,11 ± 1,98 ^{abBC}
	Sem sal – 45 min	38,50 ± 2,57 ^{bE}	11,31 ± 2,27 ^{aA}	23,32 ± 2,23 ^{aB}
	Com sal – 15 min	52,24 ± 6,63 ^{aABC}	-0,09 ± 0,19 ^{dF}	10,97 ± 0,88 ^{dG}
	Com sal – 30 min	51,15 ± 0,59 ^{aD}	1,38 ± 0,49 ^{cdEF}	15,83 ± 0,82 ^{cE}
	Com sal – 45 min	48,14 ± 2,28 ^{aE}	2,85 ± 1,08 ^{bcCDE}	20,33 ± 1,96 ^{bCD}

L*: Luminosidade (L* = 0 = preto; L* = 100 = branco). a*: coordenadas vermelho/verde (+a = vermelho; -a = verde). b* = coordenadas amarelo/azul (+b* = amarelo; -b* = azul). Dados representados com valor das médias de cada amostra ± desvio padrão (n=6). ^{a-d}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma variedade do pinhão indica diferença significativa (p < 0,05) entre tratamentos aplicados. ^{A-F}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa (p < 0,05) entre os tratamentos aplicados e variedades do pinhão concomitantemente.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 8 - Resultados da microscopia de fluorescência dos sólidos presentes nas águas de cozimento do pinhão comum e macaco tempo de 45 minutos sem sal.



A: Micropartícula da água de cozimento do pinhão macaco; B: Micropartícula da água de cozimento do pinhão comum. Autofluorescência indicando a presença de compostos fenólicos e lignina (composto fenólico estrutural). Cor vermelha, setas indicadas locais de maior concentração de compostos fenólicos, e cor azul brilhante indica a presença de ligninas.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Tabela 5 - Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) das águas de cozimento do pinhão comum e macaco, em diferentes tempos, com e sem sal.

Pinhão	Tratamentos	Fenólicos totais (mg EAG 100 mL ⁻¹)	Capacidade antioxidante (mM TE 100 mL ⁻¹)	
			DPPH	FRAP
Comum	Sem sal – 15 min	12,13 ± 0,22 ^{dD}	9,70 ± 3,98 ^{cH}	68,15 ± 1,34 ^{cD}
	Sem sal – 30 min	16,93 ± 0,80 ^{cC}	17,27 ± 3,99 ^{bG}	95,77 ± 2,17 ^{bB}
	Sem sal – 45 min	36,37 ± 6,71 ^{aA}	43,84 ± 1,13 ^{aD}	209,26 ± 2,33 ^{aA}
	Com sal – 15 min	9,28 ± 1,78 ^{dDE}	4,70 ± 3,15 ^{cH}	63,50 ± 1,94 ^{cD}
	Com sal – 30 min	17,80 ± 2,93 ^{cC}	19,13 ± 2,48 ^{bFG}	94,64 ± 6,57 ^{bB}
	Com sal – 45 min	26,99 ± 3,36 ^{bB}	18,41 ± 0,76 ^{bFG}	99,41 ± 2,16 ^{bB}
Macaco	Sem sal – 15 min	8,91 ± 0,69 ^{cDE}	26,36 ± 4,66 ^{dE}	50,87 ± 1,84 ^{cE}
	Sem sal – 30 min	17,06 ± 1,32 ^{bC}	77,07 ± 7,26 ^{cC}	78,20 ± 2,99 ^{bC}
	Sem sal – 45 min	26,53 ± 2,87 ^{aB}	131,36 ± 7,58 ^{bB}	100,39 ± 3,06 ^{aB}
	Com sal – 15 min	6,30 ± 1,50 ^{cE}	4,57 ± 1,28 ^{eH}	44,18 ± 0,74 ^{dF}
	Com sal – 30 min	8,19 ± 0,23 ^{cDE}	25,64 ± 3,89 ^{dEF}	48,50 ± 1,25 ^{cE}
	Com sal – 45 min	17,83 ± 4,15 ^{bC}	149,21 ± 2,53 ^{aA}	74,64 ± 3,36 ^{bC}

EAG: Equivalente de ácido Gálico. TE: Trolox equivalente; Dados representados com valor das médias de cada amostra ± desvio padrão (n=6). ^{a-e}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma variedade do pinhão indica diferença significativa (p < 0,05) entre tratamentos aplicados. ^{A-H}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa (p < 0,05) entre os tratamentos aplicados e variedades do pinhão concomitantemente.

No presente trabalho, também foram identificados os compostos fenólicos extraídos nas águas de cozimento por HPLC-ESI-MS/MS, onde um cromatograma representativo é apresentado na Figura 9, para as águas de cozimento do pinhão comum, sem sal, em tempo de cozimento de 45 minutos.

Na Tabela 6 são apresentados os compostos fenólicos individuais que foram identificados e quantificados nas amostras de água do pinhão macaco e comum. Os parâmetros para identificação e quantificação de compostos fenólicos, como tempo de retenção, limite de identificação e quantificação e íons pais estão apresentados na Tabela no anexo B.

Além dos compostos identificados e quantificados, pode ser observado na Figura 9 que outros picos ocorrem em diferentes tempos de retenção, sendo que ácido gálico, ácido mandélico e ácido 4-hidroximetilbenzóico, apresentam características de compostos antioxidantes (Anexo B). Os compostos encontrados no presente trabalho diferem dos encontrados por Santos e colaboradores (2018), que estudaram o extrato hidro-alcoólico do pinhão comum.

A Vanilina foi o composto fenólico encontrado apenas nos extratos sem adição de sal. Este composto é um dos compostos aromatizantes mais utilizados popularmente extraídos das favas da baunilha e é amplamente utilizado em alimentos, bebidas e cosméticos (TAI et al., 2011). Nas últimas duas décadas, propriedades antimutagênicas da vanilina foram relatadas (TAI et al., 2011). Segundo Imanishi et al. (1990) a vanilina reduz significativamente as mutações induzidas por luz ultravioleta ou raios-X em células de mamíferos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Mutações induzidas em células da medula óssea de camundongos também foram reduzidas pela ação da vanilina (SANTOS et al., 1999).

O ácido protocatecuico foi o composto fenólico encontrado em todas as amostras (4,77 mg L⁻¹ na C3, 3,92 mg L⁻¹ na C6, 6,49 mg L⁻¹ na M3 e 4,05 mg L⁻¹ na M6), o que comprova que a extração aquosa sem sal, para ambos os pinhões é mais eficiente na extração de compostos fenólicos do pinhão. Devido às suas propriedades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante, pode estar associado potencialmente como quimiopreventivo (TANAKA, TANAKA, TANAKA, 2011), além de apresentar outros efeitos contra doenças crônicas e inflamações (D'ARCHIVIO et al. 2018).

Tabela 6 - Compostos fenólicos (HPLC-MS) das águas de cozimento do pinhão comum e macaco com e sem sal.

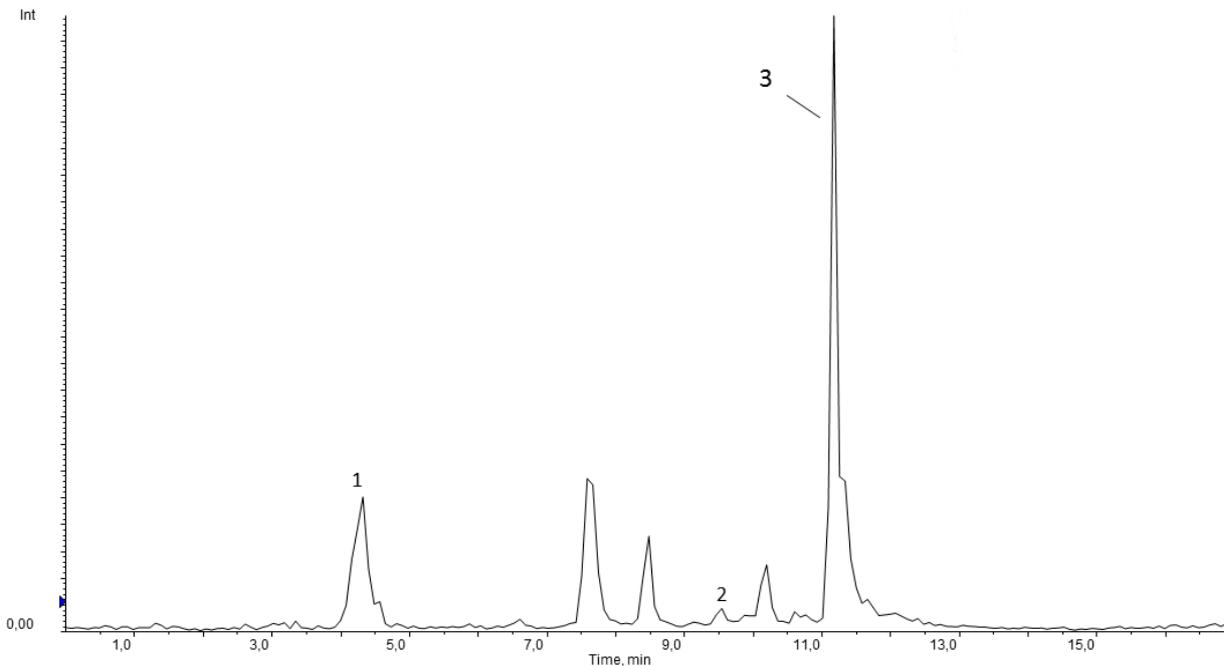
Compostos fenólicos (HPLC-MS) (mg/L)	Amostras			
	C3	C6	M3	M6
Vanilina	0,12 ± 0,04 ^A	-	0,17 ± 0,03 ^A	-
Ácido protocatecuico	4,77 ± 1,02 ^{aAB}	3,92 ± 1,02 ^{aB}	6,49 ± 1,48 ^{aA}	4,05 ± 1,24 ^{aAB}
Coniferaldeído	0,26 ± 0,13 ^{bB}	0,57 ± 0,08 ^{aA}	0,31 ± 0,11 ^{aB}	0,27 ± 0,14 ^{aB}

Dados representados com valor das médias de cada amostra ± desvio padrão (n=6). ^{a-b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha e na mesma variedade do pinhão indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos aplicados;

^{A-B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indica diferença siginificativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados e variedades do pinhão concomitantemente. C3 -pinhão comum sem sal cozimento de 45 minutos; C6 – pinhão comum com sal cozimento de 45 minutos; M3 – pinhão macaco sem sal cozimento 45 minutos; M6 -pinhão macaco com sal cozimento de 45 minutos.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Figura 9 - Cromatograma representativo da identificação de compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS em água de cozimento do pinhão comum com cocção a 45 minutos sem sal.



1- Ácido protocatecuico; 2- vanilina; 3- coniferaldeído.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O composto fenólico coniferaldeído também estava presente em todas as amostras avaliadas, porém em maior quantidade no extrato do pinhão comum com sal cozimento de 45 minutos.

Tem sido relatado que o coniferaldeído exerce funções benéficas ao organismo humano, tais como atividades antioxidante (Alanon et al., 2011) e anti-inflamatórias (Shi et al., 2006; Korkina et al., 2007). Além disso, Kim et al. (2016) elucidaram os mecanismos pelos quais o coniferaldeído regula a ativação da heme oxigenase-1 e do fator 2 relacionado ao fator eritróide da transcrição nuclear; e o efeito citoprotetor do coniferaldeído na morte celular, exercendo função citoprotetora contra a morte celular.

A presença destes compostos nas águas de cozimento do pinhão não é suficiente para indicar a bioacessibilidade e propriedades funcionais dos mesmos. Por isso, uma análise da bioacessibilidade em digestão gastrointestinal simulada *in vitro* será realizada, visando melhor estudar as águas de cozimento dos pinhões comum e macaco.

Com esta composição e presença de compostos fenólicos, as águas de cozimento não apresentaram atividade antimicrobiana em todos os ensaios realizados. A atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas pode ser dependente da estrutura e pode ser mais influenciada por compostos fenólicos específicos, não presentes ou em baixa quantidade nos extratos testados, do que pela concentração de fenólicos totais nos extratos. Além disso, apesar do tratamento térmico poder amolecer os tecidos vegetais e facilitar a extração dos compostos da matriz celular (BLESSINGTON et al., 2010), o aquecimento utilizado para o preparo dos extratos aquosos do pinhão comum e do pinhão macaco pode ter influenciado a capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos. Entre os fatores que afetam a lixiviação de compostos fenólicos da matriz, pode-se incluir a polaridade do meio utilizado (MINATEL et al., 2017). Compostos fenólicos hidrofóbicos apresentam melhor capacidade para alterar a permeabilidade da membrana celular e mitocondrial, tornando-as mais permeáveis com consequentes perdas de íons e moléculas (CARSON et al., 2002). Portanto, além da baixa concentração de compostos fenólicos obtidos para os extratos avaliados, a utilização de água pode não ter extraído os compostos fenólicos hidrofóbicos que apresentariam atividade antimicrobiana da matriz estudada. Por outro lado, todas as culturas bacterianas utilizadas encontravam-se na fase estacionária de reprodução. Quando as bactérias estão nesta fase elas se encontram mais resistentes à ação dos antimicrobianos. Thomas et al. (2000) e Bordignon-Juniore et al. (2012) reportaram que é mais recomendável avaliar a ação de compostos

antimicrobianos sob a fase logarítmica do crescimento bacteriano, uma vez que estas apresentam maior susceptibilidade aos antimicrobianos. Castellano et al. (2003) também corroboram com esta hipótese, uma vez que observaram em seus estudos resultados de susceptibilidade melhores frentes a *Escherichia coli* na fase exponencial do que na fase estacionária.

4. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho, investigando pela primeira vez os efeitos do tempo de cozimento e da presença do cloreto de sódio na extração de compostos fenólicos do pinhão para a água de cozimento, abre uma perspectiva de futuras aplicações para essas águas. As características de retenção de proteína solúvel nas amostras do pinhão macaco, com sal, nos diferentes tempos de cozimento, indicam para a realização de futuros trabalhos de identificação dos mecanismos químicos responsáveis por este comportamento. A cor na tonalidade marrom tendendo para o vermelho, reforça a presença destes compostos, comprovado também pela microscopia de fluorescência dos sólidos presentes neste extrato aquoso. A identificação por HPLC-ESI-MS/MS, revela que esses compostos presentes com características antioxidantes, devem ser estudados quanto a bioacessibilidade neste tipo de extrato de pinhão comum e macaco, com e sem adição de sal. A falta de efeito antimicrobiano observada neste trabalho pode estar relacionada a baixa concentração de compostos fenólicos obtidos para os extratos avaliados. Por fim, todas as culturas bacterianas utilizadas encontravam-se na fase estacionária de reprodução, o que as tornam mais resistentes à ação dos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

ALANÓN, M.E.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; DÍAZ-MAROTO, I.J.; VILA-LAMEIRO, P.; PÉREZ-COELLO, M.S. Cyclic polyalcohols: fingerprints to identify the botanical origin of natural woods used in wine aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, pp.1269–1274, 2011.

AL-OBAIDI, R. S. S.; SAHIB, D. H. Determination of antioxidant activity in tea extracts. **American Journal of Biochemistry**, v. 5, p. 49-52, 2015.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis. Gaithersburg. 18 ed. 2005.

ARRIOLA, N. A. et al. Potential of nanofiltration for the concentration of bioactive compounds from watermelon juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 2052–2060, 2014.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BLESSINGTON, T., NZARAMBA, M. N., SCHEURING, D. C., HALE, A. L., REDDIVARI, L., MILLER, J. C. Cooking methods and storage treatments of potato: Effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics. **American Journal of Potato Research**, v.87. pp.479–491, 2010.

BORDIGNON-JUNIOR, S. E.; MIYAOKA, M. F.; COSTA, J. L.; BENAVENTE, C. A. T.; COUTO, G.H.; SOCCOL, C. R. Inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas em microdiluição por tratamento com Nisina e EDTA. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, vol. 3, n. 4, pp. 127-135, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

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

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; VIGNOLO, G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157 : H7 in frozen groundbeef patties. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1461-1465, 2011.

CUNHA, I.P., MELO, D. W., VERRUCK, S., MARAN, B. M., PRUDENCIO, E. S. AMANTE, E. R. Bioaccessibility of Phenolic Compounds of *Araucaria angustifolia* from Seed Water Extracts during In Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food and Nutrition Sciences**, v. 9, p. 1137-1146, 2018.

D'ARCHIVIO, M., SCAZZOCCHIO, B., SILENZI, A., GIOVANNINI, C., MASELLA, R. Role of Protocatechuic Acid in Obesity-Related Pathologies: An Update. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease. 2018.

DAVID, A. A. R de; SILOCHI, R. M. H. Q. Avaliação de métodos para a conservação de pinhão. **Revista Faz Ciência**. v.12, n. 15, p.207-216, 2010.

IMANISHI, H.; SASAKI, Y.F.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, M.; OHTA, T.; SHIRASU, Y.; TUTIKAWA, K. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin, **Mutation Research**, v.243, pp. 151–158, 1990.

KIM K.M.; HEO D.R.; KIM Y.A.; LEE J.; KIM N.S.; BANG O.S. Coniferaldehyde inhibits LPS-induced apoptosis through the PKC α/β II/Nrf-2/HO-1 dependent pathway in RAW264.7 macrophage cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.48, pp.85–93, 2016.

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

KORKINA, L.G.; MIKHAL'CHIK, E.; SUPRUN, M.V.; PASTORE, S.; DAL TOSO, R., Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. **Molecular and Cellular Biology**, v.53, pp.84–91, 2007.

LIMA, E.C., ROYER, B., VAGHETTI, J.C.P., BRASIL, J.L., SIMON, N.M., DOS SANTOS, A.A., et al. Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* Wastes: Determination of the Optimal Conditions by Statistic Design of Experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, p. 211-220, 2007.

LUNKES, L. B. F.; HASHIZUME, L. N. Evaluation of the pH and titratable acidity of teas commercially available in Brazilian market. **Revista Gaúcha de Odontologia**. 2014, vol.62, n.1, pp.59-64.

MINATEL, I. O.; BORGES, C. V.; FERREIRA, M. I.; GOMEZ, H. A.; CHEN, C.-Y. O.; LIMA, G. P. P. Phenolic compounds: functional properties, impact of processing and bioavailability. In SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS,

M. R. (EDS.). **Phenolic Compounds - Biological Activity**, Intechopen Ed., 2017.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M2-A8**: padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. 8 ed. Anvisa, v. 23, n.1. Substitui a Norma M2-A7 v. 20, n.1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2018.

SANTOS, C. H. K. et al. Systematic study on the extraction of antioxidants from *pinhão* (*Araucaria angustifolia* (bertol.) kuntze) coat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 216-223, 2018.

SANTOS, J.H.; GRAF, U.; REGULY, M.L.; ANDRADE, H.H.R. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.444, pp.355–365, 1999.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, n. 2, p. 125-131, 2015.

SHANON, E.; JAISWAL, A. K.; ABU-GHANNAM, N. Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: a kinetic study. **Food Research**, v. 2, p. 1 -11, 2018.

SHI, H.M., WEN, J.; JIA, C.Q.; JIN, W.; ZHANG, X.F.; YAO, Z.R.; TU, P.F. Two new phenolic glycosides from the barks of *Hydnocarpus annamensis* and their anti-inflammatory and anti-oxidation activities. **Planta Medicinal**, v.72, pp.948–950, 2006.

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

TAI, A.; SAWANO, T.; YAZAMA, F.; ITO, H. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1810, pp. 170–177, 2011.

TANAKA, T., TANAKA, T. TANAKA, M. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 3, n. 1, p. 27-33. 2011.

THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVESBROUGHTON, J.
Nisin. In: NAIDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. New
York: CRC Press, p. 463-524, 2000.

CAPÍTULO 3

BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* DURANTE A DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA *IN VITRO*.

Artigo Publicado:

DA CUNHA, I. P.; DE MELO, D. W., VERRUCK, S.; MARAN, B. M.; ELANE SCHWINDEN PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E.R. Bioaccessibility of Phenolic Compounds of *Araucaria angustifolia* from Seed Water Extracts during In Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food and Nutrition Science**, v. 9, p. 1137-1146, 2018. O comprovante está apresentado no Anexo C.

Bioacessibilidade de compostos fenólicos do extrato aquoso de sementes de *Araucaria angustifolia* durante a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*.

RESUMO

Subprodutos alimentares contendo substâncias bioativas, como compostos fenólicos, têm chamado a atenção devido à possibilidade de aumentar o valor de outra forma do que seria considerado resíduo. O presente trabalho procurou avaliar a extração de compostos fenólicos e sua bioacessibilidade em extratos de água de cozimento de pinhão “comum” (*Araucaria angustifolia* var. *Angustifolia*) e pinhão “macaco” (*Araucaria angustifolia* var. *Indehiscens*) em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Os resultados indicam que as mudanças ocorreram dependendo do tipo de extrato e da etapa gastrointestinal. Embora ambos os extratos de pinhão avaliados apresentem compostos fenólicos bioacessíveis, a diminuição gradual da bioacessibilidade do extrato de pinhão “macaco” durante etapas da condição gastrointestinal simulada *in vitro*, caracteriza este extrato como o de melhor propriedade funcional. A propriedade funcional está relacionada as propriedades antioxidantes que são capazes de gerar efeitos protetores contra várias doenças.

Palavras Chave: *Araucaria angustifolia*. Extrato de Pinhão. Compostos Fenólicos. Bioacessibilidade *In vitro*, Propriedades Funcionais.

Bioaccessibility of phenolic compounds of *Araucaria angustifolia* from seed water extracts during *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

ABSTRACT

Food by-products containing bioactive substances, such as phenolic compounds, have garnered attention due to the possibility to increase the value of what would otherwise be considered residue. The present work sought to evaluate the extraction of phenolic compounds and their bioaccessibility from pinhão “comum” (*Araucaria angustifolia* var. *angustifolia*) and pinhão “macaco” (*Araucaria angustifolia* var. *indehiscens*) cooking water extracts during *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. Our findings indicate that changes occurred depending on the type of extract and the gastrointestinal step. Although both of the evaluated pinhão extracts displayed bioaccessible phenolic compounds, the gradual bioaccessibility decrease of pinhão “macaco” extract during *in vitro* simulated gastrointestinal condition steps, characterizes this extract as the one with the best functional property. The functional property is related to antioxidant properties which are able to generate protective effects against various diseases.

Keywords: *Araucaria angustifolia*, Pinhão Extract, Phenolic, *In Vitro* Bioaccessibility, Functional Properties.

1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* é uma árvore que ocupa grandes áreas no sul e sudeste Brasil. Sementes de araucária que possuem uma casca resistente são chamadas pelos brasileiros de pinhão.

O pinhão, normalmente é consumido após a fervura das sementes em água até o completo amolecimento, no entanto, a casca e a água de cozimento são geralmente descartadas como resíduo (LIMA et al, 2007). O uso sustentável do pinhão pode contribuir para conservação, estimulando o consumo racional e moderado do produto (DAUDT et al., 2014). Sementes de pinhão cozidas têm valor comercial estabelecido, enquanto suas cascas têm sido usadas como adsorvente para remover íons de efluentes líquidos (LIMA et al., 2007), a parte comestível do pinhão, conhecida como amêndoa, é considerada uma fonte alternativa de lectina (SANTI-GADELHA et al., 2006), amido (DAUDT et al., 2014) e compostos fenólicos (CORDENUNSI et al., 2004). Santos et al. (2018) afirmam que as sementes de pinhão são ricas em compostos fenólicos.

Em um estudo anterior de Koehnlein et al. (2018), afirmam que o cozimento poderia promover a migração de compostos fenólicos da casca de pinhão para a água de cozimento. No entanto, até onde sabemos, os compostos fenólicos do extrato de água de cozimento do pinhão ainda não foram estudados.

Santos et al. (2018) também destacaram que os subprodutos alimentares contendo substâncias bioativas, como os compostos fenólicos, têm atraído a atenção pela possibilidade de aumentar o valor para a indústria alimentícia, dos chamados resíduos. Considerando a eficácia das substâncias bioativas no sistema dietético e os efeitos promotores de saúde, a demanda por estes compostos naturais está aumentando.

Um número incontável de estudos foi publicado com foco em compostos fenólicos de diferentes alimentos, que exibem uma ampla gama de efeitos biológicos, tais como efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer.

No entanto, até o momento, nenhum estudo levou em consideração os efeitos do processamento sobre compostos fenólicos nem avaliou a bioacessibilidade do extrato de água de cozimento pinhão.

Em relação a essas avaliações, alguns estudos utilizaram curvas analíticas de ácido gálico para quantificar os compostos fenólicos. Além disso, também observamos que muitos estudos expressaram o conteúdo fenólico total pelo método de Folin-Ciocalteu. Além disso, Jara-Palacios et al. (2018) definiram a bioacessibilidade como a quantidade de um

constituente alimentar que é liberado de uma matriz alimentar complexa no lúmen do trato gastrointestinal e poderia estar potencialmente disponível para absorção no corpo, bem como promover ações biológicas.

Esses autores também apontam que o primeiro passo para avaliar os possíveis efeitos de um composto é determinar sua estabilidade durante a digestão gastrointestinal. Neste caso, eles também destacam que o método da condição gastrointestinal simulada *in vitro* é uma alternativa simples, acessível e reprodutível aos modelos *in vivo* e clínico. Outro ponto positivo é que o método *in vitro* está isento de quaisquer considerações éticas em relação ao estudo, menos dispendioso e adequado para triagem de uma ampla gama de amostras em diferentes condições fisiológicas.

Com o objetivo de avaliar a *Araucaria angustifolia*, uma espécie ameaçada com particular importância sociocultural, muitas vezes utilizada como alternativa econômica para moradores locais, foram avaliadas duas variedades diferentes. Peralta et al. (2016) citaram que, devido a *A. angustifolia* estar ameaçada de extinção, o cultivo dessa espécie recebeu forte incentivo de agências governamentais relacionadas ao meio ambiente e à agricultura, e muitos esforços têm sido realizados para propagá-la e conservá-la, como o pinhão “comum” e o pinhão “macaco”. A importância do pinhão comum está relacionada à sua maior frequência nas propriedades rurais, enquanto o pinhão “macaco”, caracterizado por ser de difícil remoção e amplamente consumido pelos macacos, é uma variedade inexplorada.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivos determinar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e sua bioacessibilidade a partir dos extratos aquosos de pinhão (*Araucaria angustifolia* var. *Angustifolia*) e pinhão “macaco” (*Araucaria angustifolia* var. *Indehiscens*) durante condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

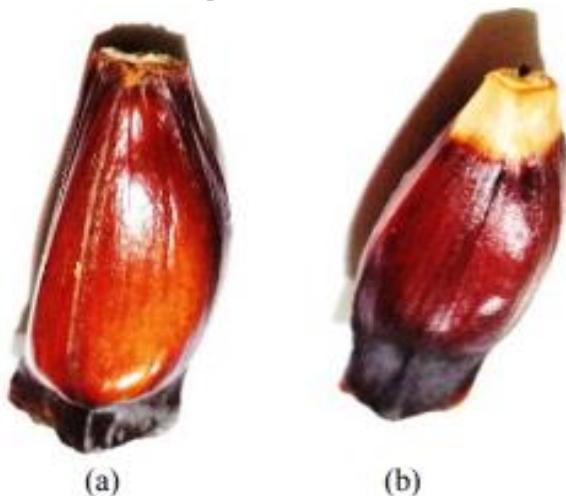
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

O experimento foi conduzido com sementes maduras localmente consideradas pinhão “comum” (*Araucaria angustifolia* var. *Angustifolia*) e pinhão “macaco” (*Araucaria angustifolia* var. *Indehiscens*) colhida em 2018 no estado de Santa Catarina (Brasil) (Figura 10). O reagente de fenol Folin-Ciocalteu e ácido gálico utilizados nos testes foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

Durante a avaliação das condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, as seguintes enzimas foram utilizadas: α -amilase (28,75 U mg⁻¹ de proteína); pepsina da mucosa gástrica de porco (400 U mg⁻¹ de proteína); pancreatina do pâncreas suíno (poder digestivo - 8 \times especificações USP); sais biliares bovinos. Os reagentes mencionados foram adquiridos da Sigma Aldrich. Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico.

Figura 10 - Pinhão comum e pinhão macaco



Sementes (a) pinhão “comum” (*Araucaria angustifolia* var. *Angustifolia*) e (b) pinhão “macaco” (*Araucaria angustifolia* var. *Indehiscens*).

Fonte: Elaborado pela autora.

2.2 Preparo dos extratos de pinhão

O extrato de cada uma das variedades de pinhão foi obtido conforme ilustrado na Figura 11. Resumidamente, dois extratos foram preparados, um de pinhão comum e outro de pinhão macaco, que foram previamente lavados em água e drenados. Cada uma dessas variedades de sementes de pinhão foi cozida separadamente em triplicata com água destilada por 45 minutos, utilizando-se a relação sementes: massa de água a 1: 100, em panela de pressão (Clock[®], São Bernardo do Campo, Brasil). Essa razão foi calculada a partir de ensaios baseados no processo de cozimento tradicional do pinhão. Após o cozimento, as sementes foram drenadas e dos lotes dos três extratos foi feito um pool misturado em vórtex (Biomixer VTX-F, São Paulo, Brasil), a fim de se obter uma

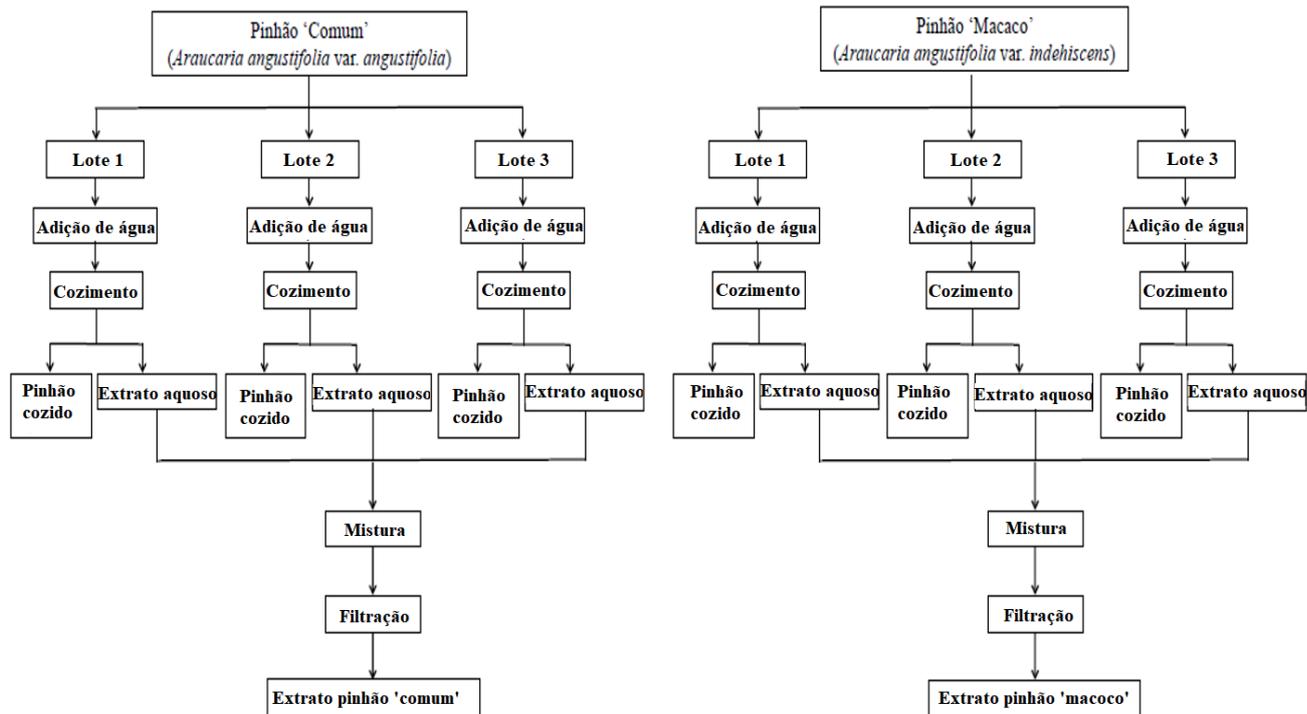
amostra homogênea. Ambos os extratos de pinhão foram filtrados com papel filtro (12,5 cm de diâmetro e 25 μm de poro); resfriado e mantido a uma temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ até simular as condições gastrointestinais *in vitro*.

2.3. Condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

As condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foram realizadas em triplicata, simulando as condições típicas predominantes na boca, esôfago-estômago, duodeno e íleo humano, sequencialmente (Figura 12), como proposto por Verruck et al. (2015). Primeiramente 2 mL de extrato pinhão comum e pinhão macaco foram adicionados em frascos estéreis e expostos às condições gastrointestinais supracitadas. Durante os testes *in vitro*, ajustes de pH em todas as amostras foram realizados com NaHCO_3 0,1 mol L^{-1} ou HCl 0,1 mol L^{-1} . A temperatura foi mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$, e a intensidade dos movimentos peristálticos em cada parte do sistema digestivo humano foi montada utilizando banho-maria (Dist DI950M, Florianópolis, Brasil). As soluções da enzima foram preparadas imediatamente antes da utilização e purificadas por filtração usando um filtro de membrana de 0,22 μm (MF-Millipore, Billerica MA, USA). Após a microfiltração, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo até uso nas condições gastrointestinais simuladas. Esta análise foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina.

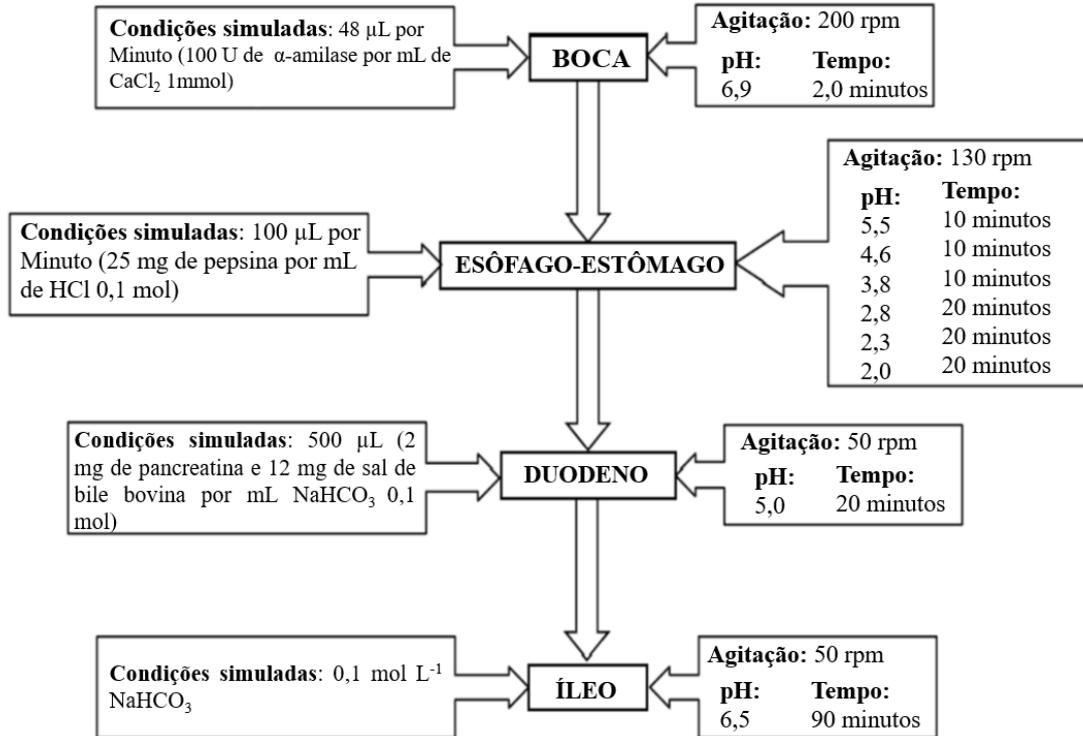
Assim como ocorre naturalmente na digestão, o volume total de trabalho aumentou durante as etapas de condições gastrintestinais simuladas *in vitro*, por esse motivo esses volumes foram corretamente diluídos antes da análise do conteúdo fenólico total.

Figura 11 - Diagrama do preparo dos extratos do pinhão 'comum' e 'macaco'.



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Figura 12 - Protocolo dos extratos de pinhão sob condições gastrintestinais simuladas in vitro.



Fonte: Adaptada de Verruck et al. (2015).

2.4. Compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado usando o ensaio de Folin-Ciocalteu (SINGLETON;ROSSI, 1965). Esta análise foi realizada no Laboratório de Frutas e Hortaliças, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. Extratos de Pinhão e alíquotas de cada etapa das condições gastrointestinais simuladas in vitro foram utilizados para análises de CFT. Para isso, 500 µL de extrato de pinhão ou amostra de cada etapa e 2500 µL de reagente 0,25 Folin-Ciocalteu foram misturados em um vortex (Biomixer VTX-F, São Paulo, Brasil) e deixados por 5 minutos. Depois, 2000 µL de solução de carbonato de sódio (7,5 %) foram adicionados. Esta mistura foi homogeneizada em vortex e mantida no escuro por duas horas. Absorbância medida a 765nm num espectrofotômetro (Hitachi U1800, Tóquio, Japão). O ácido gálico foi empregado como padrão de calibração e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg EAG 100 mL⁻¹).

2.5. Bioacessibilidade de compostos fenólicos totais

Para avaliar o efeito de cada etapa das condições gastrointestinais simuladas in vitro (boca, estômago, duodeno e íleo) sobre o conteúdo fenólico, a bioacessibilidade foi calculada de acordo com a Equação 1, conforme descrito por Juaníz et al. (2016).

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \text{CFTA/CFTB} \times 100 \quad (1)$$

Onde: CFTA é o conteúdo fenólico (mg g⁻¹ de extrato de pinhão comum ou pinhão macaco) quantificado após etapas de condições gastrointestinais simuladas, e CFTB é o conteúdo fenólico quantificado antes do estímulo às condições gastrointestinais simuladas (inicial) e expressas na mesma unidade.

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA), e o teste de Tukey foi empregado para determinar as diferenças significativas (P <0,05) entre os resultados amostrais, utilizando o software STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA).

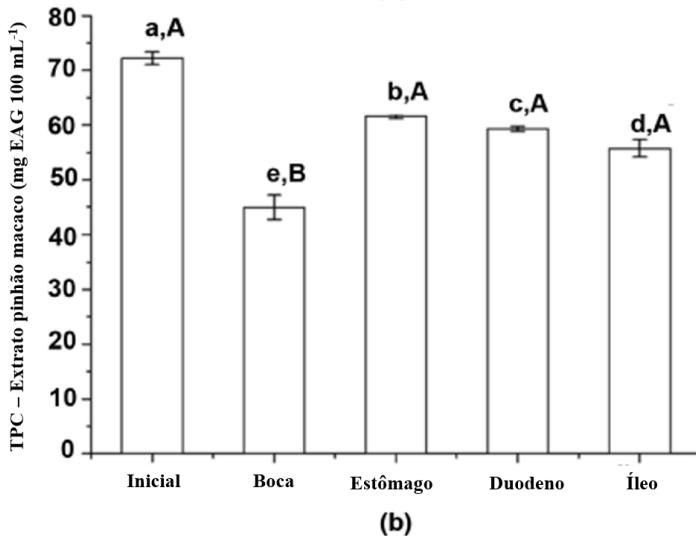
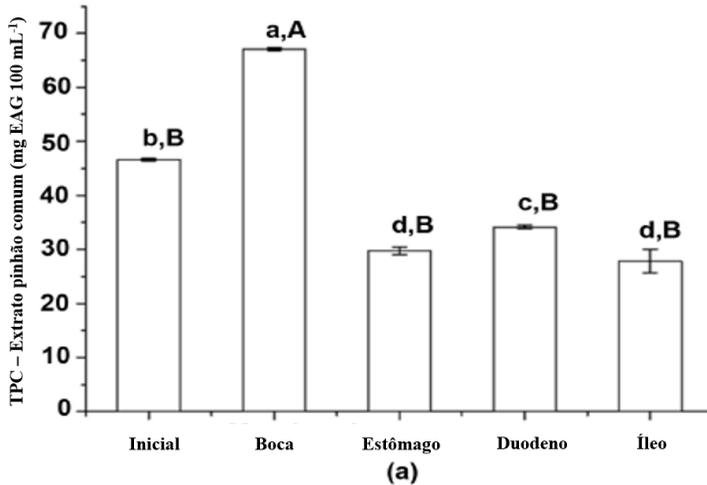
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos de pinhão comum e pinhão-macaco; bem como o de amostras de cada etapa simulada das condições gastrintestinais são mostradas na Figura 13. Antes da digestão, o extrato do pinhão “macaco” apresentou maior ($P < 0,05$) CFT (72,22 mg EAG 100 mL^{-1} de extrato) do que o extrato pinhão comum (46,62 mg EAG 100 mL^{-1} de extrato). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Williams et al. (2013), que verificaram que o tipo e o teor de compostos bioativos poderiam variar significativamente entre cultivares. Herranz et al. (2019) citaram que os compostos fenólicos estão normalmente ligados a constituintes da parede celular, como polissacarídeos e proteínas, exigindo a ruptura da parede celular, a fim de permitir que os compartimentos celulares se tornem bioacessíveis, no entanto, a bioacessibilidade fenólica pode ser afetada por alguns fatores.

Zheng et al. (2018) destacaram que o conteúdo fenólico dos alimentos não reflete seu potencial de bioacessibilidade, que depende de muitos fatores, como a capacidade de liberação da matriz alimentar e a estabilidade digestiva. Vale ressaltar que esses pontos podem ser responsáveis por diferenças nos comportamentos dos compostos fenólicos de ambos os extratos do pinhão, antes e após as etapas das condições gastrointestinais simuladas. No entanto, esses comportamentos estão de acordo com os obtidos recentemente por Herranz et al. (2018), Jara-Palacios et al. (2018), Qin et al. (2018) e Zheng et al. (2018) para produtos de cebola e maçã, diferentes extratos de subprodutos da vinificação branca, frutos secos e sementes de *L. Rubusidaeus* e para espinheiro chinês, respectivamente. É possível observar que, em nosso estudo, grandes mudanças no CFT foram encontradas entre amostras digeridas e não digeridas, incluindo entre etapas de digestão.

Após a etapa da boca, o extrato de pinhão comum apresentou maior ($P < 0,05$) compostos fenólicos (67,02 mg EAG 100 mL^{-1}) bioacessibilidade, 2,2 vezes maior (Tabela 7) do que o extrato do pinhão “macaco” (44,96 mg EAG 100 mL^{-1}). Ou seja, a quantidade de fenólicos liberados do extrato de pinhão comum apresentou maior ($P < 0,05$) teor de compostos fenólicos liberados após a digestão bucal quando comparado ao extrato inicial de pinhão. Tais mudanças podem surgir devido a grandes diferenças nas variedades de amostra.

Figura 13 - Teor de compostos fenólicos totais (CFT) do extrato (a), pinhão 'comum' (inicial) e (b) extrato pinhão 'macaco'.



(Inicial); e após cada etapa simulada de condições gastrointestinais (boca, estômago, duodeno e íleo). ^{a-c}Para a mesma amostra, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as etapas gastrointestinais. ^{A-}^BDiferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($P < 0,05$), entre o mesmo passo das condições gastrointestinais simuladas.

Tabela 7 - Resultados da bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais (CFT) (media \pm desvio padrão) do extrato pinhão comum e do extrato pinhão-macaco após cada etapa das condições gastrointestinais simuladas.

Etapas	Extrato pinhão ‘comum’	Extrato pinhão ‘macaco’
Inicial	-	-
Boca	143,90 ^{aA} \pm 1,32	63,59 ^{dB} \pm 2,58
Estômago	63,25 ^{cB} \pm 1,66	86,18 ^{aA} \pm 1,98
Duodeno	73,55 ^{bB} \pm 0,67	82,39 ^{bA} \pm 0,66
Íleo	60,28 ^{cB} \pm 4,87	78,80 ^{cA} \pm 1,62

Inicial = é o conteúdo fenólico quantificado antes das condições gastrointestinais simuladas. ^{a-c}Dentro de uma coluna, diferentes letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as diferentes etapas das condições gastrointestinais simuladas para cada amostra. ^{A-B}Numa linha, diferentes letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a mesma etapa das condições gastrointestinais simuladas entre amostras.

É provável que uma porção de compostos fenólicos possa se transformar em formas estruturalmente diferentes, com diferentes características químicas, resultando, conseqüentemente, em diferentes resultados de bioacessibilidade. De maneira geral, esses diferentes níveis de bioacessibilidade aos CFT observados após o passo da boca, entre os dois extratos de pinhão, podem ser devido aos seus diferentes compostos bioativos. Celep et al. (2017) concluíram que um aumento significativo no conteúdo fenólico total após o passo na boca poderia estar relacionado à liberação gradual de fenóis, de proteínas e outras biomoléculas, levando à alteração na estrutura química e propriedades funcionais. Esses autores também postularam que o incremento no conteúdo total de ácido fenólico pode ser devido à agitação ou atividade enzimática durante o passo da boca. Com relação à redução da bioacessibilidade do extrato pinhão-macaco, esse comportamento não é consistente com os resultados de CFT geralmente encontrados após a etapa oral. No entanto, vale ressaltar que o ácido gálico também aparece, embora em menor concentração.

Esperava-se que o baixo pH e a ação da pepsina nas etapas do esôfago / estômago liberassem alguns compostos fenólicos ligados aos carboidratos, diluindo os compostos fenólicos mais bioacessíveis. Nesta etapa, para o extrato pinhão “macaco”, o CFT (61,60mg EAG 100 mL⁻¹) foi maior ($P < 0,05$) do que foi encontrado para o extrato de pinhão “comum” CFT (29,76 mg EAG 100 mL⁻¹), indicando um maior aumento na bioacessibilidade do extrato pinhão “macaco” (86,18 %) versus pinhão comum (63,25 %). No entanto, segundo Qin et al. (2018), a diminuição de CFT e bioacessibilidade observados para o extrato de pinhão comum

podem estar relacionados ao elevado número de compostos fenólicos liberados anteriormente durante o passo da boca. Comparando o CFT após os passos do esôfago / estômago com os resultados encontrados no final da etapa do duodeno, hipotetizamos que os compostos fenólicos liberados anteriormente também são responsáveis pelo aumento ($P < 0,05$) e diminuição ($P < 0,05$) observado para o CFT e bioacessibilidade do pinhão comum (54,13 mg EAG 100 mL⁻¹ e 73,55 %) e pinhão “macaco” (59,31 mg EAG 100 mL⁻¹ e 82,39%), respectivamente.

Em relação aos compostos fenólicos, após a etapa do íleo, os valores de ácido gálico diminuíram ($P < 0,05$) para os extratos pinhão comum (27,80 mg EAG 100 mL⁻¹) e pinhão macaco (55,88 mg EAG 100 mL⁻¹). Isso segue estudos anteriores de Tagliazucchi et al. (2010) e Jara-Palacios et al. (2018), que relataram que o ácido gálico foi degradado sob condições pancreáticas. Esse comportamento está associado a uma diminuição ($P < 0,05$) na bioacessibilidade dos compostos fenólicos, após a etapa do íleo, para ambos os extratos de pinhão (Tabela 7), quando comparados aos resultados encontrados no final da etapa do duodeno.

Após a etapa do íleo, observamos que o extrato pinhão-macaco apresentou maior bioacessibilidade fenólica (78,80 %) ($P < 0,05$) do que o extrato pinhão comum (60,28 %). Considerando que nem todos os compostos fenólicos ingeridos podem ser absorvidos após a etapa do estômago, e que o extrato de pinhão “macaco” mostrou uma diminuição gradual da bioacessibilidade ($P < 0,05$) desses compostos após o estômago, duodeno e íleo, isso nos leva a concluir que o extrato de pinhão é uma fonte potencial maior de compostos fenólicos que são capazes de atingir o cólon e podem ser metabolizados pela microbiota ali presente.

4. CONCLUSÃO

Mudanças no conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos de pinhão foram testadas antes e após condições gastrointestinais simuladas, com o extrato de pinhão “macaco” apresentando a maior concentração de compostos fenólicos após a digestão *in vitro*.

Os resultados também indicaram que os compostos fenólicos totais foram afetados pelas etapas de digestão, independentemente do tipo de extrato. Esse comportamento pode estar relacionado à transformação estrutural de compostos fenólicos. Foi observado que a alta quantidade de compostos fenólicos liberados durante as etapas da condição gastrointestinal é responsável pela diminuição da bioacessibilidade na próxima etapa.

Ainda assim, apesar de ambos os extratos de pinhão apresentarem compostos fenólicos bioacessíveis, a diminuição gradual da bioacessibilidade do extrato de pinhão “macaco” durante etapas da condição gastrointestinal simulada *in vitro*, leva a concluir que este extrato é o que apresenta as melhores propriedades funcionais. As propriedades funcionais creditadas aos compostos fenólicos podem exibir uma ampla gama de efeitos biológicos, tais como efeitos protetores contra várias doenças, devido às suas propriedades antioxidantes bem estabelecidas.

REFERÊNCIAS

- CELEP, E.; İNAN, Y.; AKYÜZ, S.; YESILADA, E. The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. **Industrial Crops and Products**, v.109, p.717-723, 2017.
- CORDENUNSI, B. R.; WENZEL, E. M.; GENOVESE, M. I.; COLLI, C.; GONÇALVES, A. S.; LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine *Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.3412-3416, 2004.
- DAUDT, R. M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVERA, F.; THYS, R. C. S.; MARCZAK, L. D. F. Determination of properties of pinhão starch: analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v.52, p.420-429, 2014.
- HERRANZ, B.; FERNÁNDEZ-JALAO, I.; DOLORES ÁLVAREZ, M.; QUILES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; HERNANDO, I.; DE ANCOS, B. Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 51 p. 114-125, 2019.
- JARA-PALACIOS, M. J.; GONÇALVES, S.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J. Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v.109, p. 433-439, 2018.
- JUÁNIZ, I.; LUDWIG, I. A.; BRESCIANI, L.; DALL’ASTA, M.; MENA, P.; DEL RIO, D.; CID, C.; PEÑA, M. P. Catabolism of raw and

cooked green pepper (*Capsicum annuum*) (poly) phenolic compounds after simulated gastrointestinal digestion and faecal fermentation.

Journal of Functional Foods, v. 27, p. 201-213, 2016.

KOEHNLEIN, E. A.; CARVAJAL, A. E. S.; KOEHNLEIN, E. M.; COELHO-MOREIRA, J. S.; INACIO, F. D.; CASTOLDI, R.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinho (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, p.512-518, 2018.

LIMA, E. C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J. C. P.; BRASIL, J. L.; SIMON, N. M.; SANTOS JR, A. A.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L.P.; BENVENUTTI, E. V.; SILVA, E. A. Adsorption of Cu (II) on *Araucaria angustifolia* wastes: determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, p. 211-220, 2007.

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

QIN, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LI, Y.; WU, Z. Release of Phenolics compounds from *Rubus idaeus* L. dried fruits and seeds during simulated *in vitro* digestion and their bio-activities. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p.57-65, 2018.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, A. A., ARAGÃO, K.S., DE OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M. R. L; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SANTOS, C. H. K.; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M.F.; FERREIRA, C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; BONA, E.; SILVA, V. M.; LEIMANN, F. V. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*Araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) Coat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 216-223, 2018.

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

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v.120, p.599-606, 2010.

VERRUCK, S.; PRUDÊNCIO, E. S.; VIEIRA, C. R. W.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. de M. The buffalo Minas frescal cheese as a protective matrix of Bifidobacterium BB-12 under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p.1179-1183, 2015.

WILLIAMS, D. J.; EDWARDS, D.; HAMERNIG, I.; JIAN, L.; JAMES, A. P.; JOHNSON, S. K.; TAPSELL, L. C. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: a review. **Food Research International**, v.52, p.323-333, 2013.

ZHENG, G.; DENG, J.; WEN, L.; YOU, L.; ZHAO, Z.; ZHOU, L. Release of phenolic compounds and antioxidant capacity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*" during *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p.76-85, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi pioneiro no estudo do extrato aquoso de duas variedades de pinhão sem a utilização de solventes orgânicos, mostrando que esse resíduo descartado após o preparo para consumo apresenta compostos fenólicos e atividade antioxidante, abrindo uma perspectiva para o desenvolvimento de produtos na indústria alimentícia e de bebidas e assim também contribuir para um maior equilíbrio ambiental.

Apesar das águas de cocção dos pinhões comum e macaco não terem apresentado atividade antimicrobiana, sugere-se novos ensaios com diferentes e maiores concentrações. Neste trabalho foi utilizado 100g de pinhão para 1000 mL de água destilada para cocção, é sabido que na maioria das vezes o volume de pinhão a ser cozido é pelo menos de 5 a 10 vezes mais, sugerindo talvez uma concentração final maior de compostos fenólicos, podendo assim apresentar atividade antimicrobiana.

No decorrer dos ensaios *in vitro* ambos os extratos de pinhão apresentaram compostos fenólicos bioacessíveis, apesar da diminuição gradual da bioacessibilidade do extrato de pinhão “macaco” durante as etapas da condição gastrointestinal simulada, constatou-se que esse extrato, apresentou as melhores propriedades funcionais creditadas aos compostos fenólicos que podem exibir uma ampla gama de efeitos biológicos, tais como efeitos protetores contra várias doenças, devido às suas propriedades antioxidantes.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos *in vivo* para avaliar se os extratos aquosos de ambas as variedades de pinhão não são tóxicos.
- Excluindo a toxicidade desses extratos, realizar estudos *in vivo* para avaliar efeitos anti-hipertensivos, antiglicêmicos, emagrecedores e outros.
- Realizar novas análises em extratos mais concentrados, na tentativa de quantificar outros compostos fenólicos.
- Efetuar novos ensaios microbiológicos com concentrações diferentes de sólidos solúveis nas águas de cozimento dos pinhões.
- Realizar uma avaliação sensorial dessas águas de cocção visando o desenvolvimento de uma bebida.
- Investigar e caracterizar as propriedades do amido no pinhão macaco, comparando com o amido do pinhão comum.
- Determinar a composição centesimal do pinhão macaco, para melhor aproveitar esta variedade de pinhão.
- Elaborar um estudo botânico atualizado sobre as variedades da *Araucaria angustifolia*.
- Implementar estudos morfológicos caracterizando e comparando o pinhão macaco e o pinhão comum.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO “COOKING WATER OF SEEDS FROM TWO VARIETIES OF *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* (BERT.) OTTO KUNTZE): COMPARATIVE EVALUATION OF PHENOLIC COMPOSITION ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES.” SUBMETIDO À REVISTA **LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY** (ISSN: 0023-6438).

Iria - Track your recent Co-Authored submission to LWT

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Iria da Cunha,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: LWT - Food Science and Technology
Title: *Araucaria angustifolia* (bert.) Otto kuntze): comparative evaluation of phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of seed water extract
Corresponding Author: Edna Amante
Co-Authors: Iria P da Cunha, Magister; Luís E Mascimento, Magister; Denise W de Melo, Magister; Fabíola C Billuca, Magister; Luciano Vitali, PhD; Ana C Coste, PhD; Deise H Ribeiro, PhD;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/lwt/default.asp?acw=&g=preRegistration.asp&usr=coauthor&fname=Iria&lname=daCunha&email=iria.pedroso@ufsc.br>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/lwt/default.asp?acw=&g=login.asp&email=iria.pedroso@ufsc.br>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at eamante@cca.ufsc.br; e.amante@ufsc.br.

Thank you,

LWT - Food Science and Technology

ANEXO B – APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS DE TODOS OS COMPOSTOS PADRÕES UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR E QUANTIFICAR OS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE COZIMENTO DO PINHÃO MACACO E COMUM

Quantidade de Compostos	Composto	[1] Soluções	Parent ion (m/z) Q1	Quantitative ion (m/z) Q3	Intensidade do sinal	Tempo de retenção	*LD (mg/L)	*LQ (mg/L)
1	4- aminobenzoico	1000ppm	135.85	90.5	0.2 ppm – área 1.4x10 ⁴	10.47	0,039	0,187
2	Ácido salicílico	1000ppm	136.9	91.1	0.2 ppm – área 1.5x10 ⁶	10.99	0,002	0,005
3	Ácido cinâmico	992ppm	146.886	100.7	0.2 ppm – área 5.0x10 ⁴	11.80	0,025	0,103
4	Ácido p-anísico	1150ppm MeOH	150.832	105.20	0.2 ppm – área 1.3x10 ⁴	11.34	0,030	0,058
5	Ácido mandélico	1130 ppm	150.875	106.80	0.2 ppm – área 4.3x10 ⁴	7.86	0,041	0,147
6	Vanilina	1000ppm	150.892	132.8	0.2 ppm – área 9.5x10 ⁴	10.42	0,007	0,027
7	Ácido 4- hidroximetilbenzoico	1030ppm em MeOH	150.899	104.20	0.2 ppm – área 7.5x10 ⁴	8.84	0,020	0,070
8	Protocatecuico	1020ppm MeOH 50%	153.019	109.0	0.2 ppm – área 1.4x10 ⁵	6.95	0,010	0,037
9	Umbeliferona	1010ppm em 90% EtOH	160.802	129.5	0.2 ppm – área 5.1x10 ⁵	10.78	0,001	0,003
10	Ácido p-cumárico	1020 ppm	163.040	119.0	0.2 ppm – área 6.8x10 ⁵	10.46	0,001	0,004
11	Ácido vanílico	1000ppm	166.831	148.50	0.2 ppm – área 1.7x10 ⁴	9.65	0,011	0,022

12	Ácido gálico	1000ppm em MeOH	168.836	124.1	0.2 ppm – área 9.0×10^4	3.98	0,041	0,069
13	Coniferaldeído	2020ppm em MeOH	176.865	160.30	0.2 ppm – área 6.2×10^5	11.31	0,002	0,005
14	Ácido caféico	1000ppm	178.834	131.30	0.2 ppm – área 6.0×10^5	9.45	0,008	0,020
15	Siringaldeído	1000ppm	180.873	163.10	0.2 ppm – área 5.2×10^4	10.76	0,009	0,021
16	Escopoletina	1170ppm	190.727	172.80	0.2 ppm – área 3.2×10^5	10.99	0,001	0,004
17	Ácido ferúlico	1010ppm	192.856	129.70	0.2 ppm – área 1.2×10^5	10.73	0,002	0,006
18	Ácido siringico	1000ppm	196.862	119.60	0.2 ppm – área 5.2×10^4	10.01	0,006	0,019
19	Sinapaldeído	1430ppm em 50% MeOH	206.901	174.40	0.2 ppm – área 1.2×10^5	11.39	0,003	0,009
20	Ácido sinápico	1000ppm em MeOH	222.885	161.60	0.2 ppm – área 3.2×10^4	10.87	0,005	0,013
21	Resveratrol	1140ppm	226.875	181.60	0.2 ppm – área 7.2×10^4	11.14	0,008	0,029
22	Chrysin	1000ppm	252.870	62.20	0.2 ppm – área 1.2×10^6	13.88	0,003	0,009
23	Pinocembrin	580ppm	254.954	60.70	0.2 ppm – área 1.6×10^5	13.59	0,006	0,010
24	Apigenina	1060ppm em MeOH	268.794	114.80	0.2 ppm – área 6.2×10^5	12.62	0,001	0,003
25	Galangina	1000ppm em EtOH	268.811	59.900	0.2 ppm – área 1.2×10^5	13.44	0,002	0,006
26	Naringenina	1062ppm em MeOH	270.847	150.20	0.2 ppm – área 5.2×10^5	12.37	0,001	0,004

27	Kaempferol	990ppm 100% MeOH	284.808	62.60	0.2 ppm – área 6.2x10 ⁴	12.34	0,026	0,098
28	Eriodictiol	426ppm em MeOH	286.823	132.10	0.2 ppm – área 1.9x10 ⁵	11.85	0,002	0,006
29	Aromadendrin	970ppm em MeOH	286.824	123.90	0.2 ppm – área 3.1x10 ⁵	11.29	0,002	0,007
30	Fustin	990ppm em 90% EtOH	286.835	105.60	0.2 ppm – área 1.9x10 ⁵	10.32	0,045	0,0102
31	Catequina	1000ppm s/ data	288.853	120.30	0.2 ppm – área 5.4x10 ⁴	8.82	0,004	0,011
32	Epicatequina	1600 ppm em MeOH	288.948	122.30	1.0 ppm – área 1.5x10 ⁴	9.41	0,003	0,011
33	Hispidulina	1010ppm em 90% EtOH	298.825	282.70	0.2 ppm – área 5.2x10 ⁵	12.72	0,001	0,004
34	Ácido elágico	1000ppm	300.813	142.50	1.0 ppm – área 6.1x10 ⁴	11.71	0,096	0,297
35	Quercetina	1070ppm	301.010	149.30	0.2 ppm – área 5.1x10 ⁴	10.84	0,001	0,004
36	Taxifolina	1000ppm em 90% EtOH	302.815	120.70	0.2 ppm – área 2.8x10 ⁴	10.70	0,003	0,010
37	Miricetrina	1000ppm 90% em EtOH	316.875	150.60	0.2 ppm – área 4.6x10 ⁴	11.24	0,003	0,008

38	Carnosol	590ppm em 100% ACN	329.008	284.00	0.2 ppm – área 9.2×10^5	14.32	0,001	0,004
39	Ácido clorogênico	1000ppm	352.863	187.80	0.2 ppm – área 3.5×10^5	9.19	0,002	0,007
40	Ácido rosmarínico	1000ppm MeOH	358.995	159.80	0.2 ppm – área 3.2×10^5	10.83	0,001	0,004
41	Naringina	1050ppm	579.910	150.00	0.2 ppm – área 9.2×10^4	11.18	0,005	0,016
42	Rutina	1040ppm em MeOH	609.147	301.00	0.2 ppm – área 3.7×10^4	10.72	0,005	0,016
43	Isorientina	925ppm em MeOH	462,9	300	0.2 ppm – área 3.6×10^4	10,83	0,002	0,008

*LD=limite de detecção; LQ=limite de quantificação

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

ANEXO C – ARTIGO “BIOACCESSIBILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS OF *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* FROM SEED WATER EXTRACTS DURING *IN VITRO* SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS.” PUBLICADO NA REVISTA FOOD AND NUTRITION SCIENCE.

Artigo completo disponível em: [10.4236/fns.2018.910082](https://doi.org/10.4236/fns.2018.910082)



Food and Nutrition Sciences, 2018, 9, 1137-1146

<http://www.scirp.org/journal/fns>

ISSN Online: 2157-9458

ISSN Print: 2157-944X

Bioaccessibility of Phenolic Compounds of *Araucaria angustifolia* from Seed Water Extracts during *In Vitro* Simulated Gastrointestinal Conditions

Iria Pedroso da Cunha^{1,2}, Denise Wibelinger de Melo¹,
Silvani Verruck¹, Bruna Marchesan Maran³,
Elane Schwinden Prudencio¹, Edna Regina Amante¹

¹Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Agricultural Science Center, Florianópolis, Brazil

²Department of Morphological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Biologicals Sciences Center, Florianópolis, Brazil

³Department of Chemistry and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Technological Center, Florianópolis, Brazil

Email: elane.prudencio@ufsc.br

How to cite this paper: da Cunha, I.P., de Melo, D.W., Verruck, S., Maran, B.M., Prudencio, E.S. and Amante, E.R. (2018) Bioaccessibility of Phenolic Compounds of *Araucaria angustifolia* from Seed Water Extracts during *In Vitro* Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food and Nutrition Sciences*, 9, 1137-1146.
<https://doi.org/10.4236/fns.2018.910082>

Received: September 11, 2018

Accepted: October 6, 2018

Published: October 10, 2018

Copyright © 2018 by authors and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Food by-products containing bioactive substances, such as phenolic compounds, have garnered attention due to the possibility to increase the value of what would otherwise be considered residue. The present work sought to evaluate the extraction of phenolic compounds and their bioaccessibility from pinhão “comum” (*Araucaria angustifolia* var. *angustifolia*) and pinhão “macaco” (*Araucaria angustifolia* var. *indehiscens*) cooking water extracts during *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. Our findings indicate that changes occurred depending on the type of extract and the gastrointestinal step. Although both of the evaluated pinhão extracts displayed bioaccessible phenolic compounds, the gradual bioaccessibility decrease of pinhão “macaco” extract during *in vitro* simulated gastrointestinal condition steps, characterizes this extract as the one with the best functional property. The functional property is related to antioxidant properties which are able to generate protective effects against various diseases.

Keywords

Araucaria angustifolia, Pinhão Extract, Phenolic, *In Vitro* Bioaccessibility, Functional Properties