

JOSIANE HILBIG

**PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E EFEITO  
ANTITUMORAL *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EXTRATOS DA  
CASCA DE NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**

**Florianópolis  
2017**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

**Josiane Hilbig**

**PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E EFEITO  
ANTITUMORAL *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EXTRATOS DA  
CASCA DE NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jane Mara Block

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rozangela Curi Pedroza

**Florianópolis  
2017**

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

Hilbig, Josiane

Perfil de Compostos Fenólicos e Efeito Antitumoral *In Vivo* e *In Vitro* de Extratos da Casca de Noz Pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] / Josiane Hilbig ; orientadora, Jane Mara Block ; coorientadora, Rozangela Curi. – Florianópolis, SC, 2017.

191 p.

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

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. casca de noz pecã. 3. fenólicos totais. 4. atividade antioxidante. 5. atividade anticarcinogênica. I. Block, Jane Mara. II. Pedroza, Rozangela Curi. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

**PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E EFEITO  
ANTITUMORAL *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EXTRATOS DA  
CASCA DE NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**

**Por**

**Josiane Hilbig**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de — Doutor em  
Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 28 de agosto de 2017.

---

Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina De Oliveira Costa  
Coordenadora

**Banca examinadora:**

---

Prof.(a). Dr.(a). Jane Mara Block  
Orientadora (UFSC)

---

Prof.(a). Dr.(a). Rozangela Curi Pedrosa  
Co-orientadora (UFSC)

---

Prof.(a). Dr.(a). Daniel Granato,  
Membro Externo (UEPG)

---

Prof.(a). Dr.(a). Karina Bettega Felipe,  
Membro Externo (UFPR)

---

Prof.(a). Dr.(a). Carmen Maria Olivera Müller,  
Membro Interno (UFSC)

---

Prof.(a). Dr.(a). Itaciara Larroza Nunes,  
Membro Interno (UFSC)

---

Prof.(a). Dr.(a). Giustino Tribuzi  
Suplente (UFSC)



## AGRADECIMENTOS

Sobretudo agradeço a **Deus** pela oportunidade e saúde concedidas a mim para realização desse grande sonho.

Agradeço à minha mãe, **Cleci Hilbig**, que sempre acreditou na importância dos estudos e me inseriu neste mundo mágico do conhecimento desde minha primeira infância. E mais tarde ao meu pai, **Edson Fernandes de Oliveira**, por ao lado de minha doce mãe, proporcionar a continuidade dessa jornada.

Agradeço ao meu amado esposo, **Luciano Paes Caldas**, pelo grande incentivo antes e durante a execução desse projeto. Pela paciência em ouvir incansável minhas angústias, lamentos com experimentos que não deram certo, ou meu entusiasmo com resultados que para mim eram incríveis, mas que para ele não faziam o menor sentido. Obrigada meu anjo por ter sido parte ativa de cada dia da minha jornada, e por conquistar junto comigo esse sonho.

Obrigada **Jane Mara Block**, pela oportunidade concedida, por me acolher com carinho como aluna e acreditar na minha capacidade. Pela confiança depositada em tantos momentos, pelos conselhos acadêmicos e pessoais, pelas conversas e discussões sobre tantos assuntos, por exigir de mim o meu melhor em todas as etapas, contribuindo dessa forma para minha excelente formação acadêmica. E me dando a oportunidade de conquistar mais do que uma professora/orientadora, mas sim uma amiga para a vida.

Agradeço com todo carinho à professora **Rozangela Curi Pedrosa**, minha co-orientadora, pela excelente parceria firmada durante todo o trabalho e por abrir as portas do seu laboratório, Labioex, com tanto acolhimento. Também, pelo lindo exemplo de profissional, ética e seriedade nas pesquisas, que me animam a seguir nesta carreira de pesquisadora.

Às minhas queridas colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras, **Elinete Eliete de Lima, Rossana Podestá, Ana Claudia Berenhauer, Fernanda Demoliner, Priscila Policarpi, Gisele de Felipe e alunos/parceiros da iniciação científica**, que estiveram presente nas várias fases dessa pesquisa. Meu muito obrigada pelos dias de risadas, parcerias, discussões, paçocas, festinhas, almoços no RU, chopes e por tornarem cada dia mais leve graças a certeza de que eu não estava

sozinha, de que poderia contar com as brincadeiras e apoio de cada uma de vocês.

Obrigada aos queridos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental – Labioex, por me receberem com tanto carinho, parceria, dedicação e paciência. Esta pesquisa não teria sido possível se não houvesse a participação confiante e sempre disposta de cada um de vocês, para me ajudar nos experimentos, na interpretação dos resultados e por compartilharem comigo os seus conhecimentos em bioquímica. Portanto, meus sinceros agradecimentos a cada um de vocês, **Valdelucia Grinevicius, Nádia Mota, Luiza Will Castro, Fabiana Ourique, Rodrigo Costa Zeferino, Guilherme Zirbel, Eduardo Parisotto e Louise Purnhagen.**

Aos **professores, secretaria e coordenação do PGCAL-UFSC**, pelos conhecimentos compartilhados e acolhida, meu muito obrigada. Este trabalho não seria possível sem o apoio de toda equipe envolvida.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos. E também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela aprovação e financiamento deste projeto.

Obrigada também aos meus queridos amigos e amigas, que por tantas vezes precisei me distanciar para me dedicar aos estudos e conclusão deste trabalho. A compreensão de vocês faz parte desta conquista, e o saber de que ao final de tudo ainda estariam lá me aguardando e apoiando me fortaleceu para continuar a jornada diária.

A todos os envolvidos durante essa fase, meus sinceros agradecimentos. Tenho certeza de que por menor que tenha sido a participação, ela realmente foi extremamente importante para a conclusão desta pesquisa.

Por fim, **AGRADEÇO** pela sabedoria que os anos dedicados a essa pesquisa me proporcionaram, me fazendo entender que não existe “Bom” ou “Ruim”, “Certo” ou “Errado”, mas sim “Pontos de Vista” e “Formas de Interpretação”! **OBRIGADA!!**



## RESUMO

A casca de noz pecã é utilizada pela população do sul do Brasil para o preparo de chás com alegação de propriedades benéficas à saúde, como o efeito protetor e curativo contra diabetes, obesidade e distúrbios do metabolismo lipídico. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar extratos da casca de noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] obtidos por extração assistida por ultrassom e avaliar seus efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*. As maiores concentrações de compostos fenólicos no extrato aquoso foram obtidas sob as condições de extração de 60 °C, razão sólido: solvente de 30 mL/g e tempo de extração igual a 35 minutos. No extrato hidroalcolico as maiores concentrações de compostos fenólicos foram obtidas com temperatura de extração igual a 80 °C, razão sólido: solvente de 30 mL/g, concentração de etanol de 20 % v/v e tempo de extração de 25 minutos. Sob essas condições obteve-se concentração de compostos fenólicos totais de 426 e 582 mg GAE/g de extrato, taninos condensados de aproximadamente 77 e 71 mg CE/g, atividade antioxidante pelo método ABTS de 2574.32 e 2573.0 µmol TEAC/g, e pelo método DPPH 1268.0 e 1287.0 µmol TEAC/g para os extratos aquoso e hidroalcolico, respectivamente. No extrato aquoso foram identificados por LC-ESI-MS/MS, 29 compostos fenólicos no extrato hidroalcolico 27 compostos, sendo catequina e ácido gálico os compostos majoritários em ambos os extratos. Dos compostos identificados, 24 foram observados pela primeira vez neste material. Foram realizados ensaios para avaliação do efeito antitumoral *in vitro* (culturas de células de câncer da mama humana - MCF-7) e *in vivo* (camundongos Balb-C inoculados com tumor ascítico de Ehrlich). O extrato aquoso apresentou citotoxicidade com concentração inibitória de 50 % (IC<sub>50</sub>) em torno de 74 µg/mL de extrato. Doses de 15, 20 e 25 µg/mL do extrato mostraram efeito antiproliferativo, com redução de até 93 % no número total de colônias. O tratamento das células com o extrato aquoso promoveu a morte por apoptose culminando em grande número de células na fase G0/Sub G1 e redução do número de células na fase G1 e G2/M. Ensaios moleculares demonstraram que os compostos do extrato da casca de noz pecã foram capazes de intercalar e danificar as bases do DNA. O extrato aquoso da casca de noz pecã promoveu inibição no crescimento tumoral em camundongos Balb/C inoculados com tumor ascítico de Ehrlich em torno de 52 %, aumentando a

sobrevida dos animais tratados em 67 % ( $p < 0,05$ ). Estes efeitos foram associados ao aumento da morte celular por apoptose (55 %) com consequente modulação das proteínas Bax, p53 e Bcl-xL, envolvidas na regulação da morte celular. Nos ensaios *in vivo* o extrato também foi capaz de parar o ciclo celular na fase G1, diminuindo a expressão das proteínas ciclina A, ciclina B e CDK2 responsáveis pela regulação do ciclo celular. Nessa fase observou-se ainda que o extrato foi capaz de aumentar a expressão da proteína  $\gamma$ H2AX, indicando fragmentação do DNA das células do tumor ascítico de Ehrlich. Os ensaios para indicação da prevenção de tumores mediada pelo extrato aumentaram a sobrevida em até 68 %, diminuindo o desenvolvimento do tumor em até 46 % ( $p < 0,05$ ). Foi observado que houve aumento do número de células em apoptose em todos os grupos tratados, bem como da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e p53. Dano ao DNA das células tumorais também foi evidenciado pelo ensaio cometa e aumento da expressão da proteína  $\gamma$ H2AX. Foi observada uma redução nos níveis de peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS, aumento da glutathiona reduzida (GSH), além da modulação das enzimas envolvidas na regulação do sistema antioxidante endógeno. Os resultados obtidos indicaram que os extratos da casca de noz pecã são ricos em compostos bioativos, apresentando efeito antitumoral nos modelos avaliados.

**Palavras-chave:** casca de noz pecã, fenólicos totais, atividade antioxidante, atividade anticarcinogênica.

## ABSTRACT

Pecan nut shell is used by the south Brazilian population to prepare teas, that use the drink claiming health properties, such as the protective and curative effect against diabetes, obesity, lipid metabolism disorders. The aim of this study was to characterize pecan nut shell extracts [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] obtained by ultrasound-assisted extraction and evaluate their antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. The highest concentrations of phenolic compounds in the aqueous extract were obtained under the extraction conditions of 60 °C, solid:solvent ratio of 30 mL/g and extraction time equal to 35 minutes. The hydroalcoholic extract obtained higher concentrations of phenolic compounds using extraction temperature of 80 °C, solid:solvent ratio of 30 mL/g, ethanol concentration of 20 % v/v and 25 minutes for extraction time. Under these conditions it was obtained concentration of total phenolic compounds of 426 and 582 mg GAE/g, condensed tannins of approximately 77 and 71 mg CE/g, antioxidant activity by ABTS assay of 2574.32 and 2573.0 µmol TEAC/g, and 1268.0 and 1287.0 µmol TEAC/g on DPPH assay for aqueous and hydroalcoholic extracts, respectively. In the aqueous extract samples, the LC-ESI-MS/MS analysis identified 29 phenolic compounds, while in the hydroalcoholic extract the presence of 27 compounds was identified. Of the phenolic compounds identified, 24 of them were observed for the first time in this raw material. Antitumor effect *in vitro* (cancer cell cultures of human breast - MCF-7) and *in vivo* (BALB-C mice inoculated with Ehrlich ascites tumor (n=32)) tests were performed. The results show that the aqueous extract showed cytotoxicity with an inhibitory concentration 50 % (IC<sub>50</sub>) of the cells using 74 µg of extract. Doses of 15, 20 and 25 µg/mL of the extract also showed anti-proliferative effect on MCF-7 cells with up to 93 % reduction in total cell number. Treatment of the cells with the aqueous extract promoted cell death by apoptosis culminating in cell cycle arrest in G0/SubG1 and decreased in the number of cells in G1 and G2/M phase. Molecular assays showed that the compounds of pecan nut shell extract were able to interlate and damage the DNA bases. The pecan nut shell extract promoted an inhibition in tumor growth in mice BALB / C inoculated with Ehrlich ascites tumor around 52 %, increasing the survival of treated animals by 67 % (p<0.05). These effects were associated with increased apoptotic

cell death (55 %) with consequent modulation of the Bax, p53 and Bcl-xL, proteins involved in the regulation of cell death. In *in vivo* assays, extract was also capable of arrest the cell cycle at the G1 phase by decreasing the expression of the protein cyclin A, cyclin B, CDK2 responsible for the regulation of the cell cycle. It was observed that the extract was able to increase expression of  $\gamma$ H2AX protein, indicating DNA fragmentation of Ehrlich ascites tumor cells. Assays for preventing tumor development, made with Balb-C mice previously treated with the extracts before they have the Ehrlich ascites tumor inoculated, showed survival increased up to 68 %, and decreased on tumor growth by up to 46 % ( $p < 0.05$ ). It observed increased numbers of apoptotic death of cells in all treated groups as well as increased expression of pro-apoptotic proteins Bax and p53. DNA damage of tumor cells was also evidenced by the comet assay, and increased expression of  $\gamma$ H2AX protein. It was observed a reduction in the levels of lipid peroxidation by TBARS assay and increased on reduced glutathione (GSH), an endogenous antioxidant. Also a modulation of enzymes involved in the regulation of the endogenous antioxidant system. The results indicated that the extracts of pecan nut shells are rich in bioactive compounds, having antitumor effect both for treatment and for preventing the development of tumors.

**Keywords:** pecan nut shell, phenolic compounds, antioxidant activity, antitumor activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Nogueira Pecã – <i>Carya illinoensis</i> .....	32
<b>Figura 1.2:</b> Maturação do fruto da noz pecã.....	33
<b>Figura 1.3:</b> Posições do anel fenólico.....	37
<b>Figura 1.4:</b> Relação da atividade antioxidante de acordo com o número e posições dos grupos hidroxilas.....	38
<b>Figura 1.5:</b> Radical fenoxil e ressonância apresentada.....	39
<b>Figura 1.6:</b> Estrutura química básica de um flavonóide (A) e de alguns tipos de flavonoides (B).....	39
<b>Figura 1.7:</b> Estrutura química dos ácidos benzóicos.....	40
<b>Figura 1.8:</b> Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.....	41
<b>Figura 1.9:</b> Estrutura química das cumarinas.....	41
<b>Figura 1.10:</b> Fórmula química dos compostos fenólicos identificados no extrato da casca de noz pecã.....	44
<b>Figura 1.11:</b> Mecanismo de dano à parede celular provocado pelo uso de ultrassom.....	51
<b>Figura 1.12:</b> Fenômeno da cavitação gerado na extração assistida por ultrassom.....	52
<b>Figura 1.13:</b> Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma...54	54
<b>Figura 1.14:</b> Etapas no processo de formação de metástase.....	56
<b>Figura 1.15:</b> Fases da carcinogênese.....	57
<b>Figura 1.16:</b> Esquema representativo do ciclo celular normal.....	59
<b>Figura 1.17:</b> Esquema representativo de vários ativadores e inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio.....	62
<b>Figura 1.18:</b> Alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose e necrose.....	63
<b>Figure 2.1:</b> Response surface plots for the effect of different extraction parameters on total phenolic contents and Kinetic of time effect.....	96
<b>Figura 3.1:</b> Perfil de compostos fenólicos do extrato da casca de noz pecã.....	125
<b>Figura 3.2 (A e B):</b> dados quantitativos e imagem de formação de colônias, respectivamente, da atividade antiproliferativa contra células MCF-7 tratadas durante 24 horas com extrato da casca de noz pecã...126	126
<b>Figura 3.3:</b> Tipo de morte celular em células MCF-7 (tratamento com 44,4 µg/mL de extrato da casca de pecã).....	127

<b>Figura 3.4:</b> Porcentagem de células nas fases do ciclo celular de células MCF-7 (tratamento com 44,4 µg/mL de extrato da casca de pecã)...	128
<b>Figura 3.5:</b> Efeito da intercalação de compostos do extrato da casca de noz pecã com CT-DNA.....	129
<b>Figura 3.6:</b> Imagem quantitativa e eletroforese de dano ao DNA plasmidial.....	130
<b>Figura 3.7:</b> Inibição do crescimento tumoral em camundongos tratados durante 9 dias com extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg).....	131
<b>Figura 3.8:</b> Sobrevida camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados durante 9 dias com extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg).	131
<b>Figura 3.9:</b> Efeito do extrato da casca de noz pecã (20mg/kg) na morte de células de tumor ascítico de Ehrlich.....	132
<b>Figura 3.10:</b> Imagem de eletroforese e dados quantitativos de proteínas reguladoras do processo de morte celular.....	133
<b>Figura 3.11:</b> Análise do ciclo celular realizada em células de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos tratados com extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg).....	133
<b>Figura 3.12:</b> Imagem de eletroforese e dados quantitativos de proteínas reguladoras do ciclo celular: ciclina A, ciclina B e CDK2.....	134
<b>Figura 3.13:</b> Efeito do extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg) sobre o dano ao DNA das células de tumor ascítico de Ehrlich.....	135
<b>Figure 3.14:</b> Imagem de eletroforese e dados quantitativos de γH2AX.....	135
<b>Figure 4.1:</b> (A) – Tumor growth inhibition; (B) – Survival increased..	153
<b>Figure 4.2:</b> - (A) Percentage of viable and apoptotic cells. (B) Electrophoresis image of p53, Bax and Bcl-XL proteins. (C, D and E) Quantitative data of regulatory proteins of the cell death process. (F) Relation between Bax and Bcl-XL protein.....	154
<b>Figure 4.3:</b> (A) Percentage of cells in cycle phases; (B and C) - Electrophoresis image and quantitative data of regulatory proteins cyclin B of the cell cycle, respectively.....	155
<b>Figure 4.4:</b> (A) DNA damage index by the comet assay. (B and C) - Electrophoresis image and quantitative data of γH2AX, respectively.	156
<b>Figure 4.5:</b> Biomarkers of oxidative stress. (A) Damage on lipids - lipid peroxidation. (B) Glutathione content. (C, D, E and F) activity of GPx, GR, GST and CAT respectively.....	158

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Mecanismos de ação de compostos fenólicos em diferentes condições fisiopatológicas.....	43
<b>Table 2.1:</b> Level of coded and real values for factorial design.....	86
<b>Table 2.2:</b> Experimental and predicted values for total phenolic content of pecan nut shell extracts under different conditions of ultrasonic-assisted extraction based on a factorial design.....	92
<b>Table 2.3:</b> Optimization of extraction parameter for fitted factorial model by analysis of variance (ANOVA).....	94
<b>Table 2.4:</b> Characterization of pecan nut shell extracts.....	100





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	antioxidant activities
AE	aqueous extract
ABTS	2,2_-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid
BSA	bovine serum albumin
CAT	catalase
CE	(+) - catechin
CEUA	Comitê de ética para uso de animais
CT	condensed tannins
CT-DNA	calf thymus DNA
DCFH-DA	dichlorofluorescein diacetate
DF	degree of freedom
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	dithio-bis (2- nitrobenzoic acid)
EAC	Ehrlich ascites carcinoma
EC50	effective concentration
ECG	epicatequina galato
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGCG	epigalocatequina-3-galato
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FBS	fetal bovine serum
GAE	gallic acid
GPx	glutathiona-peroxidase

GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduced
GST	glutathione S-transferase
HE	hydroalcoholic extract (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid )
HEPES	
HPLC	chromatografia líquida de alta eficiência
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
IC <sub>50</sub>	concentração inibitória de 50%
ILS	increased life span
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LDL	low density lipoprotein
MCF-7	human breast carcinoma cells line
MDA	malondialdeído
MS	mean square
MST	mean survival time
MTT	tetrazolium salt
NC	negative control
NO	óxido nítrico
NQO	quinone oxidoreductase
OH•	radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
PBS	phosphate buffered saline
pH	potencial hidrogeniônico
RSM	response surface methodology
rTNF	receptores de fatores de necrose tumoral
SD	standard deviation
SOD	superóxido-dismutase

SS	sum of squares
TAE	tumor ascítico de Ehrlich
TBARS	thiobarbituric acid
TEAC	trolox
TFC	total phenolic content
Trolox	(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TrxR	thioredoxin reductase
UICC	União Internacional Contra o Câncer



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
OBJETIVOS.....	29
Objetivo Geral.....	29
Objetivos Específicos.....	29
<b>CAPITULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
1.1 Noz Pecã - <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) C. Koch.....	31
1.2 Casca de Noz Pecã.....	34
1.3 Compostos Fenólicos.....	36
1.3.1 Ácido Gálico.....	44
1.3.2 Ácido Clorogênico.....	45
1.3.3 Ácido p-Hidroxibenzóico.....	46
1.3.4 Epigallocatequina.....	46
1.3.5 Epicatequina Galato.....	47
1.3.6 Efeito sinérgico dos compostos fenólicos da casca de noz pecã.....	48
1.4 Extração de Compostos Fenólicos de Plantas.....	48
1.4.1 Extração assistida por ultrassom.....	49
1.5 Câncer.....	53
1.5.1 Epidemiologia do Câncer.....	53
1.5.2 Aspectos Gerais do Câncer.....	54
1.5.2 Estresse oxidativo e câncer.....	59
1.5.3 Morte celular tumoral.....	63
1.5.4 Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	65
1.5.5 Tratamento do câncer.....	66
<b>CAPITULO 2: EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM COMBINADA COM A PREPARAÇÃO E ANÁLISE DA AMOSTRA USANDO LC-ESI-MS/MS PERMITIU A IDENTIFICAÇÃO DE 24 COMPOSTOS FENÓLICOS NOVOS EM EXTRATOS DA CASCA DE NOZ PECÃ [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch]</b> .....	<b>81</b>
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	82
1. INTRODUCTION.....	83
2. MATERIALS AND METHODS.....	84
2.1 Sample preparation.....	84
2.2 Chemical reagents.....	85

2.3	Ultrasound extraction.....	85
2.4	Experimental design.....	85
2.5	Kinetic of extraction.....	86
2.6	Determination of total phenolic content (TFC).....	87
2.7	Determination of condensed tannins (CT).....	87
2.8	Antioxidant activity (AA).....	88
2.8.1	ABTS assay.....	88
2.8.2	DPPH assay.....	88
2.9	Phytochemical analysis.....	89
2.9.1	Samples preparation.....	89
2.9.2	Analysis of the phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS.....	89
2.10	Statistical analysis.....	90
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	90
3.1	Fitting the models.....	90
3.2	Factorial Response surface analysis of total phenolic contents.....	95
3.3	Optimized parameters and model validation.....	97
3.4	Kinetic of extraction.....	97
3.5	Extracts characterization.....	98
3.6	Identification and quantification of phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS.....	102
4.	CONCLUSIONS.....	106
	REFERENCES.....	106
	<b>CAPITULO 3: EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE NOZ PECÃ</b> <b>[<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch] APRESENTA</b> <b>ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA</b> <b>MCF-7 E TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH EM</b> <b>CAMUNDONGOS BALB-C.....</b>	<b>113</b>
	RESUMO.....	113
1.	INTRODUÇÃO.....	114
2.	MATERIAS E MÉTODOS.....	116
2.1	Reagentes e anticorpos.....	116
2.2	Amostras.....	117
2.3	Preparação do extrato.....	117
2.4	caracterização fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência.....	117
2.4.1	Preparação da amostra:.....	117
2.5	Ensaio <i>in vitro</i> .....	118
2.5.1	Cultura de células.....	118

2.5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	118
2.5.3 Ensaio de formação de colônias (antiproliferativo).....	119
2.5.4 Avaliação do tipo de morte celular.....	119
2.5.5 Análise do ciclo celular.....	120
2.5.6 Efeitos no DNA.....	120
2.6 Atividade antitumoral <i>in vivo</i> .....	121
2.6.1 Animais.....	121
2.6.2 Avaliação do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e análise da sobrevivência.....	121
2.6.3 Avaliação da morte celular por apoptose e parada do ciclo celular no carcinoma ascítico de Ehrlich.....	122
2.6.4 Ensaio de Cometa.....	122
2.6.5 Ensaio de Imunodeteção.....	123
2.7 Análise estatística.....	124
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
3.1 Compostos fenólicos no extrato da casca de noz pecã.....	124
3.2 Análises <i>in vitro</i> (células mcf-7).....	125
3.3 Interação dos compostos do extrato da casca de noz pecã com dna.....	129
3.4 Atividade antitumoral <i>in vivo</i> .....	130
4. CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS.....	136
<b>CAPITULO 4: EXTRATOS DA CASCA DE NOZ PECÃ [<i>Carya illinoensis</i> (Wangh) C. Kock] PREVINEM O DESENVOLVIMENTO DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM CAMUNDONGOS BALB/C.....</b>	<b>143</b>
RESUMO.....	143
ABSTRACT.....	144
1. INTRODUCTION.....	144
2. MATERIALS AND METHODS.....	146
2.1 Samples.....	146
2.2 Extract preparation.....	147
2.3 Animals.....	147
2.4 Pretreatment and tumor implantation.....	147
2.5 Assessment of cell death.....	148
2.6 Assessment of cell cycle.....	148
2.7 Assessment of DNA damage.....	149
2.8 Immunoblotting analysis.....	149
2.9 Assessment of antioxidant system.....	150

2.9.1 Lipid peroxidation analysis.....	150
2.9.2 Reduced glutathione (GSH) content.....	150
2.9.3 Glutathione reductase (GR) activity.....	150
2.9.4 Glutathione-S-Transferase (GST) activity.....	151
2.9.5 Glutathione peroxidase (GPx) activity.....	151
2.9.6 Catalase (CAT) activity.....	152
2.10 Statistical analysis.....	152
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	152
4. CONCLUSION.....	159
REFERENCES.....	159
CONCLUSÕES.....	<b>181</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>183</b>
Anexo A: Trabalhos apresentados em eventos.....	183
Anexo B: Parecer de aprovação do comitê de ética para estudos com animais.....	187
ANEXO C: Artigo publicado journal of ethnopharmacology.....	189
ANEXO D: Normas da revista journal of ethnopharmacology quanto a politica de direitos autorais.....	191



## INTRODUÇÃO

Segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC), o câncer representa cerca de 12 % das causas de óbito no mundo. Estima-se que em 2020 serão diagnosticados 20 milhões de novos casos da doença (UICC, 2014). O aumento na incidência de câncer na população está associado às alterações demográficas, redução das taxas de mortalidade e natalidade, que indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional. Dessa forma o câncer constitui um problema de saúde pública para o mundo desenvolvido e também para nações em desenvolvimento (BRASIL – Instituto Nacional do Câncer, 2006).

A carcinogênese é considerada um processo complexo que inclui fatores de risco herdados e fatores de risco ambientais como alimentação, tabagismo, ocupação e exposição à radiação e agentes químicos (BAENA RUIZ; SALINAS HERNANDEZ, 2014). A doença ocorre em múltiplos estágios e cada etapa envolve eventos moleculares, bioquímicos e celulares diferentes que contribuem para a formação do tumor maligno. Em geral as células tumorais apresentam características de autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese aumentada e invasão tecidual culminando em metástase (ZIECH et al., 2012).

As terapias tradicionais para o câncer incluem a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. No entanto, estes tratamentos apresentam um limiar muito baixo entre doses curativas e efeitos tóxicos. Isto porque, em geral, a especificidade dos tratamentos é baixa e os fármacos utilizados são incapazes de distinguir adequadamente células normais de células tumorais, causando graves efeitos adversos (BLANCO et al., 2011; MALINOWSKY et al., 2011). Assim, nos últimos anos, novas terapias têm sido associadas às abordagens clássicas, visando minimizar a ação em células normais e aumentar a especificidade e eficiência dos tratamentos, em relação às células tumorais.

Pesquisas têm demonstrado que o consumo de fitoquímicos dietéticos apresentam efeitos benéficos à saúde, incluindo propriedades quimiopreventivas e terapêuticas do câncer. Além disso, sugere-se que o

uso de fitoquímicos combinados com antioxidantes reduzem o risco de desenvolver câncer (SERAFINI; TESTA, 2009).

Considerando que a carcinogênese é um processo multi estágio, muitos compostos podem agir bloqueando ou impedindo o início do processo ou suprimindo as fases da promoção e progressão. Estas substâncias incluem ligantes de coordenação e compostos fenólicos oriundos de diversas fontes vegetais (TRACHOOTHAM et al., 2006; NAIR et al., 2007; GOPALAKRISHNAN; KONG, 2008; ZIECH et al., 2012; LIMA, DE et al., 2015).

O consumo de compostos fenólicos pode afetar várias vias metabólicas, implicando tanto na função celular normal como patológica. Assim, derivados fenólicos contribuem nos processos de adesão celular, migração e angiogênese tumoral, com efeitos benéficos pela ação inibitória nos estágios iniciais, avançados ou metastáticos do tumor (ANDROUTSOPOULOS et al., 2010; WENG; YEN, 2012).

Os compostos fenólicos são constituídos por anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, podendo variar desde uma molécula simples até um polímero de elevada massa molar e são considerados potentes antioxidantes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa atividade antioxidante é fortemente dependente do número e posições dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos, bem como do potencial redox do meio reacional (BALASUNDRAM et al., 2006).

Os compostos fenólicos de diversas fontes (CAMARGO, DE et al., 2014, 2015; AYOUB et al., 2016) apresentaram uma forte capacidade de evitar danos ao DNA induzidos pelos radicais peroxil e hidroxil, o que pode ser apontado como um possível mecanismo para diminuição de risco à iniciação do câncer (CAMARGO, DE et al., 2014).

Em estudos que avaliaram o efeito de compostos fenólicos no tratamento de tumores, os efeitos citotóxicos, estão relacionados ao bloqueio do ciclo celular seguido por apoptose das células tumorais. No entanto, poucos estudos relatam os mecanismos subjacentes à esses efeitos (ROLEIRA et al., 2015a; CHEN et al., 2016). Sugerindo maior empenho na elucidação dos mesmos.

As indústrias de alimentos geram em seus processos quantidades substanciais de subprodutos como a casca de noz pecã, que apresenta em

sua composição elevadas quantidades de compostos fenólicos (PRADO et al., 2009a, 2009b; PRADO et al., 2013). Esse resíduo do processamento da amêndoa pecã têm sido empregado como combustível de caldeira ou comercializado em pedaços para o preparo de chá. Popularmente ao consumo do chá da casca de noz pecã tem sido atribuído diversas propriedades benéficas a saúde tais como redução do colesterol e dos níveis de glicose, prevenção de distúrbios estomacais e intestinais, redução de peso, entre outros (PRADO et al., 2009a).

No sul do Brasil a casca de noz pecã é utilizada popularmente para o preparo de chá usado para o tratamento e diminuição de risco para o desenvolvimento de diabetes, obesidade, distúrbios do metabolismo lipídico e câncer. Estudos já mostraram que a infusão da casca de noz pecã tem efeito hepatoprotetor, na diminuição de risco de doenças degenerativas e danos oxidativos, todos associados à presença dos compostos fenólicos na matriz vegetal (RECKZIEGEL et al., 2011; TREVIZOL et al., 2011; MÜLLER et al., 2013).

Embora seja uma fonte rica em compostos fenólicos, a casca de noz pecã é uma matriz bastante complexa, e a extração dos compostos fenólicos pode ser subestimada quando métodos convencionais de extração são utilizados. Dessa forma a utilização da energia de ultrassom e o estudo das variáveis envolvidas no processo de extração podem otimizar a concentração de compostos fenólicos em extratos dessa espécie e consequentemente favorecer os resultados na investigação dos efeitos antitumorais.

Ainda não foram relatados na literatura efeitos antitumorais dos extratos da casca de noz pecã bem como os possíveis mecanismos envolvidos na mediação deste efeito.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar extratos da casca de noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] obtidos por extração assistida em ultrassom e avaliar seus efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos da casca de noz pecã pela técnica assistida em ultrassom;
- Verificar o efeito dos parâmetros de extração temperatura, razão sólido:solvente e volume de solvente;
- Determinar a cinética de extração a partir do teor de compostos fenólicos determinado nos extratos obtidos;
- Determinar o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), de taninos condensados (Vanilina) e a atividade antioxidante (DPPH e ABTS) nos extratos obtidos;
- Determinar o perfil cromatográfico e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Avaliar a citotoxicidade e o potencial antiproliferativo dos extratos da casca de noz pecã sobre a linhagem de células tumorais de mama humano - MCF-7;
- Verificar o tipo de morte induzido pelo tratamento de células MCF-7 com extratos da casca de noz pecã; Analisar o ciclo celular de células tumorais MCF-7 tratadas com os extratos da casca de noz pecã;
- Verificar os efeitos dos extratos da casca de noz pecã sobre o DNA através dos ensaios com DNA plasmidial e CT-DNA;
- Avaliar o efeito de sobrevida e determinar os parâmetros morfológicos de camundongos Balb/C isogênicos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extratos da casca de noz pecã;

- Avaliar a atividade pró-apoptótica, nucleásica e os efeitos sobre o ciclo celular induzidos pelo tratamento com extratos da casca de noz pecã em camundongos Balb/C isogênicos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich;
- Investigar a modulação de proteínas envolvidas nas vias de sinalização para o controle do ciclo celular, indução da apoptose e dano ao DNA em amostras de células do tumor ascítico de Ehrlich retiradas de camundongos Balb/C isogênicos tratados com os extratos da casca de noz pecã;
- Verificar o efeito preventivo do uso de extratos da casca de noz pecã sobre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos Balb/C isogênicos, através de análise da sobrevida, crescimento tumoral, tipo de morte celular, ciclo celular, dano ao DNA e modulação do sistema antioxidante endógeno.

## CAPITULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 NOZ PECÃ - *CARYA ILLINOINENSIS* (WANGENH.) C. KOCH

Originária da região central e leste da América do Norte e dos vales dos rios do México, as nozes pecã foram amplamente utilizadas pelos moradores pré-coloniais, bem como pelas tribos indígenas americanas e mexicanas. O nome "Pecã" é uma palavra de origem indígena "pacaan", usada para descrever todas as nozes que requerem força para serem rompidas (NPSA - National Pecan Shellers Association, 2014).

Botanicamente, as nogueiras são classificadas como membros da família *Juglandaceae* pertencentes ao gênero *Carya*. Além de serem cultivadas para obtenção das nozes, as nogueiras também são valorizadas pela utilidade e beleza de sua madeira, por seu valor ornamental na paisagem, e pela sua qualidade como lenha (USDA, 2014).

As maiores áreas com nogueiras plantadas estão concentradas nos Estados Unidos, seguido pelo México. Nestas regiões encontram-se as maiores diversidades de pecãs nativas. Atualmente as nozes pecãs encontram-se amplamente distribuídas na Austrália, China, Israel, Peru, África do Sul e no Brasil (GARDEA e MARTÍNEZ-TÉLLEZ, 2011).

A nogueira Pecã é uma árvore de grande porte. Considerada a maior de todas as nogueiras, pode atingir alturas de 150 metros com ampla copa arredondada (Figura 1.1). Elas crescem em solos argilosos, bem drenados, com precipitação mínima média de 30 centímetros e sem alagamentos prolongados. A floração ocorre de março a maio, com flores masculinas e femininas na mesma árvore. O fruto da nogueira Pecã é uma noz de 1 a 2 centímetros de comprimento e ½ polegada de diâmetro. A noz é envolta em uma casca fina que é dividida em seções que se abrem com a maturação (Figura 1.2) (USDA, 2010).

**Figura 1.1:** Nogueira Pecã – *Carya illinoensis*.



Fonte: <http://ocultivoavida.blogspot.com.br/2012/02/nogueira-ecan.html>



**Figura 1.2:** Maturação do fruto da noz pecã.



Fonte: <http://www.galeria.cluny.com.br/v/Botanica/frutas/noz-pecan/>

A parte aproveitável do fruto corresponde entre 40 e 60 % da massa da noz e o tamanho das nozes varia bastante de acordo com a cultivar. Na composição nutricional das nozes pecã os lipídios representam a fração principal desta oleaginosa, podendo variar de 60 a 75 % em função da cultivar, fertilização do solo, clima, localização e época de colheita (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007; ORO et al., 2008). Em média a fração lipídica é constituída por 40 % são ácidos graxos monoinsaturados, 21 % poli-insaturados e 6 % saturados (VENKATACHALAM, 2004). As outras frações são representadas em média por 10 % de proteínas, 4 % de umidade, 1,4 % de minerais, 8 % de carboidratos e 8 % de fibras totais (ORO et al., 2008).

A composição em ácidos graxos das nozes caracteriza-se pela presença de ácido oleico (62,5 %) e linoleico (27,5 %), com pequenas porcentagens de ácidos graxos palmítico (5,65 %), esteárico (2,84 %) linolênico (1,23 %) e gadoleico (0,24 %) (ORO et al., 2008).

A noz pecã pode ser utilizada na forma crua, tostada, salgada ou revestida com açúcar ou mel. Pode ser empregada em saladas, sobremesas, *snacks*, produtos de padaria, confeitaria, decoração de *cookies*, bolos, doces, tortas e sorvetes. O consumo se deve ao sabor, aroma e crocância agradáveis (SWINK, 1996 *apud* PRADO, 2008). Dentre os produtores mundiais de nozes pecã destaca-se os Estados Unidos que detém mais de 80 % da produção e outros países como México, Austrália, Israel, Argentina e Brasil (VENKATACHALAM,

2004). No Brasil os primeiros registros de produção de nozes pecã ocorreram por volta de 1910 quando a cultura da noqueira foi introduzida pelos imigrantes norte-americanos (LIMA, 2011). Na região sul do país encontra-se a maior produção de nozes pecã devido às condições climáticas ideais para seu cultivo. Em 2012, foram produzidas cerca de 5 mil toneladas das nozes nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL\_Instituto Brasileiro Geografia e Estatística, 2012).

## 1.2 CASCA DE NOZ PECÃ

Da produção total de nozes pecã, cerca de 40 a 50 % torna-se subproduto da indústria beneficiadora na forma de casca (WORLEY, 1994). A casca é de cor marrom acinzentada a castanho-claro, com sulcos e fissuras achatadas e estreitas (USDA, 2010).

A composição centesimal da casca de noz pecã é diferente do fruto. Segundo Prado et al. (2009) , as fibras são responsáveis pela fração principal com cerca de 47 % e o restante é representado por carboidratos (30 %), umidade (16 %), proteínas (2 %) e lipídios (1,1 %).

As cascas das nozes pecã também apresentam significativos teores de compostos fenólicos e taninos condensados. Villarreal-Lozoya et al. (2007) relatam que os compostos fenólicos e os taninos condensados podem estar presentes em proporções de 6 e 18 vezes, respectivamente, acima das concentrações encontradas nas nozes. Estes compostos são considerados potentes antioxidantes naturais, que podem auxiliar na prevenção de processos oxidativos tanto em alimentos como em doenças desencadeadas por estresse oxidativo de membranas.

Tradicionalmente a casca é utilizada para o preparo de chás pela população do sul do Brasil (PRADO, 2008). Popularmente, ao seu consumo são atribuídas propriedades benéficas para a saúde, destacando-se proteção contra o câncer, excesso de colesterol, prevenção contra trombose, diabetes, desintoxicação de nicotina, resíduos químicos e impurezas, artrites, obesidade, entre outros (DIVINUT, 2014).

Cientificamente são relatados efeitos do uso de extrato aquoso da casca de noz pecã contra a toxicidade induzida pela ciclofosfamida (fármaco quimioterápico) no coração, rim, fígado, bexiga, plasma e

eritrócitos de ratos. O tratamento demonstrou prevenção do desenvolvimento da peroxidação de lipídios e da depleção de glutatona reduzida (GSH) em todas as estruturas, exceto coração e plasma (BENVEGNÚ et al., 2010). Os mesmos autores também investigaram o efeito protetor do extrato aquoso da casca de noz pecã sobre o estado oxidativo e morfológico de testículos de ratos tratados com ciclofosfamida. E relatam que o tratamento impediu a queda da lactato desidrogenase, manteve os níveis de ácido ascórbico, de atividade da catalase e a integridade testicular, aumentou a atividade da superóxido dismutase e impediu parcialmente o esgotamento dos níveis de glutatona (BENVEGNU et al., 2013).

Efeitos hepatoprotetores também já foram testados e demonstraram que os extratos da casca de noz pecã reduziram a peroxidação lipídica observada em tecidos do fígado e protegeram a função hepática contra danos associados ao consumo de etanol (MÜLLER et al., 2013).

Trevizol et al. (2011) utilizaram o extrato aquoso da casca de noz pecã na prevenção e tratamento de desordens dos movimentos extrapiramidais e mostraram que a infusão foi capaz de impedir o desenvolvimento da discinesia orofacial e de distúrbios após a ingestão de drogas que promovem efeitos colaterais. O tratamento preventivo também foi capaz de reduzir o desenvolvimento de catalepsia.

O dano oxidativo induzido pela exposição à fumaça de cigarro e os parâmetros comportamentais de abstinência do fumo em modelos experimentais foram avaliados por Reckziegel et al. (2011). O uso do extrato aquoso da casca de noz pecã impediu os danos oxidativos e aumentou as defesas antioxidantes dos camundongos expostos a fumaça. Além disso, também observaram diminuição da atividade locomotora e dos sintomas de ansiedade induzidos pela ausência do fumo.

Os efeitos observados em estudos científicos foram atribuídos à presença de compostos fenólicos nos extratos, que estariam agindo como antioxidantes contra peroxidação lipídica (TREVIZOL et al., 2011; MÜLLER et al., 2013).

A atividade antioxidante dos extratos da casca de noz pecã pode mudar dependendo da variedade e safra analisada. Prado et al. (2009) apresentou resultados iniciais de atividade antioxidante em torno de 1404  $\mu\text{mol TEAC/g}$  pelo sistema ABTS e 385  $\mu\text{g TEAC/g}$  no sistema

DPPH. Os mesmos autores observaram resultados de atividade antioxidante em torno de 1723  $\mu\text{mol}$  e 561 mg de TEAC/g para os sistemas ABTS e DPPH respectivamente em análises realizadas posteriormente com extratos oriundos de cascas de outra safra (PRADO et al., 2013).

A forma de extração também influencia a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos extraídos da casca de noz pecã. Prado et al. (2013) apresentaram resultados superiores para os extratos obtidos através de infusão aquosa em comparação às amostras extraídas com etanol absoluto e fluido supercrítico associado ao uso de etanol.

Dentre os compostos fenólicos presentes nos extratos da casca de noz pecã, pelo menos cinco já foram identificados por análise de cromatografia líquida de alta eficiência, sendo eles o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido p-hidrozibenzóico, epigallocatequina e epicatequina galato (PRADO et al., 2014). Salienta-se também a presença de ácido elágico (PORTO et al., 2013).

### 1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Por definição os compostos fenólicos compreendem um grupo de moléculas classificados como metabólitos secundários em plantas que não apresentam função direta nas atividades bioquímicas primárias como crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas estão envolvidos na adaptação às condições de estresse ambiental das espécies vegetais (FARAH; DONANGELO, 2006).

Cerca de 40% dos compostos fenólicos são formados na via do acetato polimalato, originados do processo de condensação da unidade iniciadora, o acetyl-SCoA com a unidade propagadora, o malonil-SCoA. Os compostos fenólicos restantes (60 %) são originados na rota do ácido chiquímico, a partir de carboidratos (BRUNETON, 1991).

Fenóis vegetais, incluindo os ácidos fenólicos simples, flavonóides, estilbenos, e uma variedade de outros compostos polifenólicos, possuem um ou mais grupos hidroxila conjugados a um grupo hidrocarboneto aromático, o que caracteriza a estrutura fenólica (HAMINIUK et al., 2011). Assim, estes compostos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização.

Os compostos fenólicos que atuam como antioxidantes podem funcionar como terminadores de cadeias de radicais livres e como agentes quelantes de íons de metais ativos que são capazes de catalisar a peroxidação lipídica. No mecanismo de ação os antioxidantes fenólicos (PhOH) interferem com a oxidação de lipídios e de outras moléculas pela rápida doação de átomos de hidrogênio para os radicais livres, como ilustrado na reação:  $\text{ROO}^\bullet + \text{PhOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{PhO}^\bullet$  (SCHROETER et al., 2002). Além da característica de excelentes doadores de hidrogênio, os compostos intermediários dos fenólicos são radicais relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SOARES, 2002).

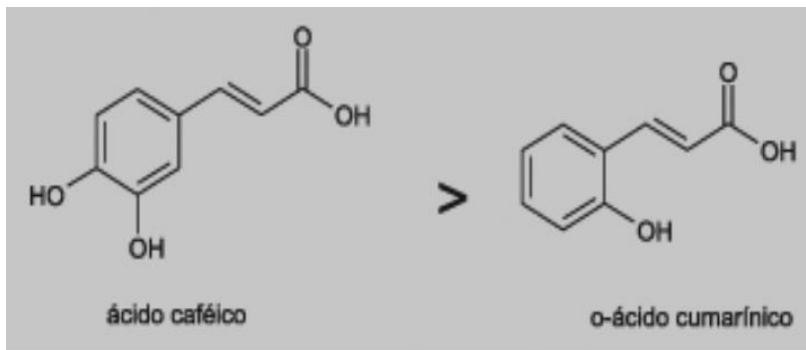
Os principais fatores que afetam a atividade dos compostos fenólicos como antioxidantes são a natureza e posição dos substituintes, bem como o número de grupos hidroxila (SCHROETER et al., 2002). Influenciam ainda a reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e a solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS et al., 2006).

Em relação à substituição da hidroxila no anel fenólico (Figura 1.3), compostos contendo a hidroxila em *para* (posição 4) são mais ativos do que aqueles substituídos em *orto* ou *meta* (posições 1 e 2, respectivamente) (Figura 1.4). A substituição na posição *para* por um grupo etil ou *n*-butil, ao invés de um grupo metil também favorece a atividade antioxidante do fenol (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992).

**Figura 1.3:** Posições do anel fenólico.



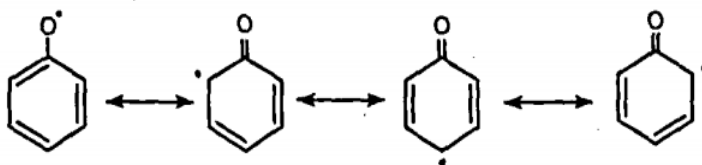
**Figura 1.4:** Relação da atividade antioxidante de acordo com o número e posições dos grupos hidroxilas



Quanto à influência do número de hidroxilas no anel aromático, Sroka; Cisowski (2003), ao analisarem 14 compostos fenólicos, concluíram que quanto menor o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, menor é a atividade antioxidante do composto. Assim, a quantidade de hidroxilas ligadas ao anel aromático é diretamente proporcional a quantidade de grupos potencialmente oxidáveis disponíveis para reação com radicais livres.

Na ação antioxidante dos compostos fenólicos durante a oxidação lipídica, os antioxidantes fenólicos interagem preferencialmente com o radical peroxil por ser este ter maior prevalência na etapa de propagação e por possuir menor energia que outros radicais, fato que favorece a abstração do hidrogênio. O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O ideal é que o radical fenoxil formado possua baixa reatividade, o que pode ser conferida pela ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado em volta do anel aromático (Figura 1.5) e pela ausência de sítios capazes de se ligar ao oxigênio (MELO e GUERRA, 2002).

**Figura 1.5:** Radical fenoxil e ressonância apresentada



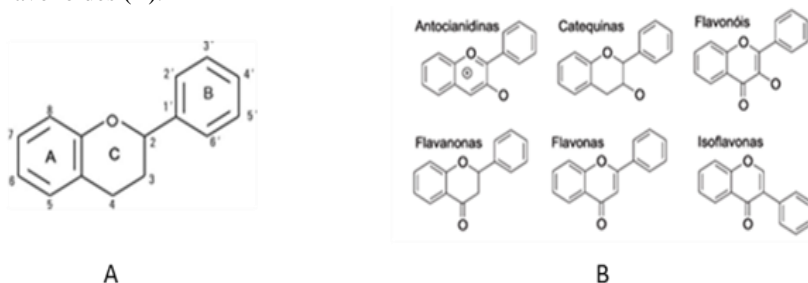
Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006

Quanto à classificação, os compostos fenólicos têm uma variedade significativa de estruturas e funções e podem ser considerados como compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides e quinonas) ou como compostos insolúveis em água (taninos condensados, ligninas e paredes celulares ligadas a ácidos hidroxicínâmicos) (HAMINIUK et al., 2011).

Além da classificação em relação à solubilidade, os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: (1) flavonóides e seus derivados e (2) ácidos fenólicos e cumarinas.

Os flavonóides possuem uma estrutura básica (Figura 1.6), formada por C6-C3-C6, sendo os compostos com maior diversidade do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, chalconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002).

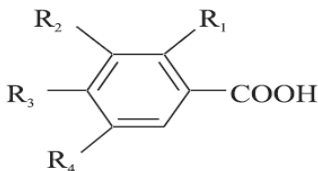
**Figura 1.6:** Estrutura química básica de um flavonóide (A) e de alguns tipos de flavonoides (B).



Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006

Quanto aos ácidos fenólicos, estes são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Sua fórmula química geral e denominações estão representadas na Figura 1.7. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 1.8). No terceiro grupo as cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (Figura 1.9) (SOARES, 2002).

**Figura 1.7:** Estrutura química dos ácidos benzóicos



Ácido salicílico:  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

Ácido gentísico:  $R_1 = R_4 = \text{OH}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{H}$

Ácido *p*-hidroxibenzoico:  $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$ ;  $R_3 = \text{OH}$

Ácido protocatequínico:  $R_1 = R_4 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{OH}$

Ácido vanílico:  $R_1 = R_4 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{OCH}_3$ ;  $R_3 = \text{OH}$

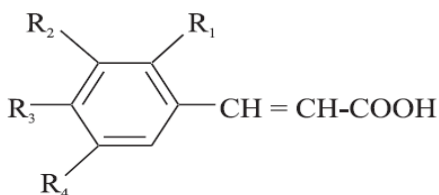
Ácido gálico:  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$

Ácido siríngico:  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$ ;  $R_3 = \text{OH}$

Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006



**Figura 1.8:** Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos



Ácido cinâmico:  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido *o*-cumárico:  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = R_3 = R_4 = H$

Ácido *m*-cumárico:  $R_1 = R_3 = R_4 = H$ ;  $R_2 = OH$

Ácido *p*-cumárico:  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ;  $R_3 = OH$

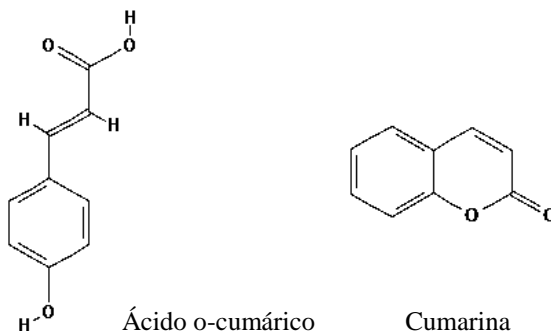
Ácido caféico:  $R_1 = R_4 = H$ ;  $R_2 = R_3 = OH$

Ácido ferúlico:  $R_1 = R_4 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$

Ácido sinápico:  $R_1 = H$ ;  $R_2 = R_4 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$

Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006

**Figura 1.9:** Estrutura química das cumarinas



Ácido *o*-cumárico

Cumarina

Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2017.

É relatado que os compostos fenólicos podem agir sobre diversas patologias com diferentes mecanismos de ação, como elucidado na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1:** Mecanismos de ação de compostos fenólicos em diferentes condições fisiopatológicas

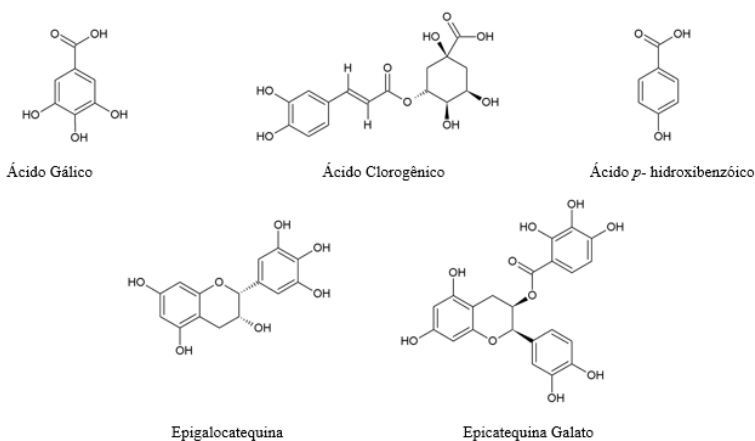
<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>Patologia</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>
Quercetina, Campesterol, Genisteína, Resveratrol	Câncer de cólon	Suprime a expressão de COX-2, inibindo a tirosina-quinase importante para a indução da expressão do gene COX-2.
Catequinas EGCG*	Doenças neurodegenerativas Condições neurodegenerativas	Aumenta a atividade da SOD e catalase Diminui a expressão de genes apoptóticos, mantendo assim a integridade da membrana mitocondrial
EGCG*	Câncer, retinopatia diabética, inflamação crônica	Supressão da angiogênese, inibindo o fator de crescimento desencadeando a ativação de receptores e PKC. Baixa regulação da produção de VEGF nas células tumorais. Repressão da AP-1, NF-κB e STAT-1 das vias de transcrição. Inibe a proliferação de células endoteliais capilares e formação de vasos sanguíneos.
Proantocianidinas	Desordens cardiovasculares	Efeitos inibitórios sobre genes pró-apoptóticos e cardiorregulatórios.
Ácido férúlico	Diabetes	Diminuir a peroxidação lipídica e aumenta o nível de glutatona e enzimas antioxidantes

\*EGCG= epigallocatequina-3-galato

Adaptado de SOOBRAATTEE et al., 2005.

Dentre os compostos fenólicos já identificados nos extratos da casca de noz pecã (Figura 1.10), três pertencem à família dos ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxibenzóico) e dois à família dos flavonóides (epigalocatequina e epicatequina galato) (PRADO et al., 2014). Em breve pesquisa bibliográfica, foi possível verificar que estes compostos já foram associados com algumas patologias conforme é possível perceber na descrição a seguir.

**Figura 1.10:** Fórmula química dos compostos fenólicos identificados no extrato da casca de noz pecã.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

### 1.3.1 Ácido Gálico

O ácido gálico (ácido 3,4,5 – Trihidroxibenzóico) caracteriza-se como um cristal branco amarelado de massa molecular em torno de 170,1 g/mol, ponto de fusão em 250 °C e solubilidade em água de 1,1 % a 20 °C (VERMA et al., 2013). É um polifenol endógeno de plantas que pode ser encontrado em sapoti, suco de uvas, chá preto, entre outras frutas (SHAHZAD; BITSCH, 1996; MA et al., 2003; RAMALHO et al., 2013). Também pode ser localizado em espécies de plantas de madeira dura como em eucaliptos (*Eucalyptus globulus*), e nas cascas da

noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] (EYLES et al, 2004; PRADO et al., 2014).

Já está estabelecido que o ácido gálico atua em várias vias farmacológicas e bioquímicas devido ao seu alto poder antioxidante (GOLUMBIC; MATTILL, 1942; KIM et al, 2002), propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticâncer (GICHNER et al., 1987; MIRVISH, 1975). Além disso, o ácido gálico pode exercer efeito pró-oxidante dependendo de sua concentração e da presença de íons metálicos. Essa ação pró-oxidante favorece a indução da apoptose em linhas celulares de câncer tais como HL-60 (leucemia), Calu-6 e A549 (câncer de pulmão), HT-29 (câncer de cólon), entre várias outras (YEN et al., 2002; BERNHAUS et al., 2009; YOU; PARK, 2010; HO et al., 2013).

Em revisão sistemática, Verma et al. (2013) apontam prováveis mecanismos de ação antitumoral do ácido gálico. Dentre eles pode-se citar: inibição da ribonucleotídeo redutase, inibição da ciclooxigenase, depleção da GSH, indução da apoptose, efeito anti-angiogênico e inibição da NF- $\kappa$ B.

### 1.3.2 Ácido Clorogênico

Os ácidos clorogênicos podem ser encontrados em uma variedade de frutas, legumes, hortaliças e vegetais como maçãs, frutas vermelhas e grãos de café (AMBRÓSIO, 2010).

A denominação ácido clorogênico foi inicialmente introduzida para designar um composto fenólico com função ácida, mas de estrutura desconhecida. Essa estrutura conferia cor verde ao meio aquoso levemente alcalino e exposto ao ar. Em 1907 o ácido foi isolado na forma de um complexo cristalino denominado clorogenato de caféina, do qual pode-se preparar um ácido puro (DE-MARIA; MOREIRA, 2004).

Recentemente, o termo ácido clorogênico tem sido utilizado para nomear uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (SOARES, 2002; DE-MARIA; MOREIRA, 2004).

Alguns trabalhos investigando os efeitos do consumo do ácido clorogênico já foram realizados, atribuindo ao ácido à capacidade de:

induzir a diminuição dos níveis sanguíneos de glicose através da inibição da enzima glicose-6-fosfatase; proteger as células  $\beta$ -pancreáticas do estresse oxidativo; reduzir os radicais livres e a formação das LDL; reduzir o peso corporal, a massa gorda visceral e os níveis de triglicerídeos e colesterol no plasma; proteger a função hepática através da prevenção da apoptose; entre várias outras ações (AMBRÓSIO, 2010; CHO et al., 2010; JI et al., 2013). Trabalhos recentes também associaram o uso de ácido clorogênico com efeitos sobre células tumorais (SISWANTO et al., 2017), incluindo hepatocarcinoma (YAN et al., 2017).

### 1.3.3 Ácido *p*-Hidroxibenzóico

O ácido *p*-hidroxibenzóico ( $C_7H_6O_3$ ) é um aleloquímico fenólico comum que é liberado no ambiente pelas plantas a partir da lixiviação foliar e/ou pela decomposição de resíduos (INDERJIT; NILSEN, 2003). É um isômero do ácido salicílico também descrito como ácido 4-hidroxibenzóico.

A partir da esterificação na posição C4, obtém-se os ésteres do ácido hidroxibenzóico que são conhecidos como parabenos. Estes ésteres são utilizados de forma isolada ou em combinação e exercem efeito como conservantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (SONI et al., 2005).

Estudo avaliando o efeito antiproliferativo e atividade pró-apoptótica de ésteres do ácido *p*-hidroxibenzóico mostrou que tais moléculas podem atuar inibindo a histona deacetilase, a qual é associada ao desenvolvimento de tumores (SEIDEL et al., 2014). Também já foi identificado que os ésteres do ácido *p*-hidroxibenzóico, na sua maior parte, não são irritantes ou sensibilizantes e que a estrutura dos parabenos não é indicativa de potencial cancerígeno (SONI et al., 2005).

### 1.3.4 Epigallocatequina

A epigallocatequina é um flavonóide da família das catequinas com peso molecular em torno e 306,27 g/mol e também identificado pelos sinônimos de (-)-cis-3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavane e/ou (-)-

*cis*-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol (SIGMA-ALDRICH, 2014).

As catequinas, entre elas a epigalocatequina, são capazes de prevenir a aterosclerose, hipertensão e cardiopatias por diminuir o estresse oxidativo, prevenir eventos inflamatórios, reduzir a agregação das plaquetas e deter a proliferação de células vasculares lisas (BHARDWAJ; KHANNA, 2013).

Ações biológicas como inibição da liberação de histamina e leucotrienos B<sub>4</sub>, citotoxicidade em cavidade oral e inibição da angiogênese já foram reportados em estudos que avaliaram o uso da epigalocatequina (KONDO et al., 2002; KIM et al., 2014). Da mesma forma, a utilização de epigalocatequina foi capaz de reduzir o desenvolvimento de artrite reumatóide em ensaios animais, bem como potencializou o efeito antioxidante a partir da modulação do sistema imune e da correção do desequilíbrio de citocinas (ROY et al., 2013).

### 1.3.5 Epicatequina Galato

A epicatequina galato (ECG) é uma catequina natural com um único grupo galoil, cuja fórmula molecular é representada por C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>. É caracterizada como um sólido cristalino com peso molecular em torno de 442,4 g/mol. Os grupos hidroxila da epicatequina galato contribuem para a sua potente atividade antioxidante e favorecem a morte de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (CAYMAN CHEMICAL, 2014).

Estudos sugerem que a (-)epicatequina galato provoca efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios em células de adenocarcinoma ductal pancreático. Esta catequina também pode suprimir a genotoxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células gliais C6 *in vitro*. No entanto, em altas concentrações, os polifenóis podem reverter os efeitos genoprotetores que produzem em baixas concentrações (CHEN et al., 2009; BERNAL et al., 2010; ABIB et al., 2011; KÜRBITZ et al., 2011).

Baek et al. (2004) demonstraram que a epicatequina galato promove uma variedade de ações sobre células de câncer colorretal humano (HCT-116), favorecendo a expressão do gene GAN-1 (gene ativado por drogas anti-inflamatórias não-esteróides) e aumentando a morte celular por apoptose induzida. A epicatequina galato também foi

capaz de inibir a sinalização de  $\beta$ -catenina e a expressão de ciclina D1, levando a supressão do crescimento celular e a indução de apoptose em carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (LIM et al., 2006).

### **1.3.6 Efeito sinérgico dos compostos fenólicos da casca de noz pecã**

Até o momento não foram encontrados estudos que isolassem e avaliassem as ações dos compostos fenólicos da casca de noz pecã. No entanto, sugere-se que os efeitos antioxidantes, hepatoprotetores e de proteção contra toxicidade de fármacos e poluentes relatados em trabalhos anteriores (BENVEGNÚ et al., 2010; RECKZIEGEL et al., 2011; TREVIZOL et al., 2011; BENVEGNUM et al., 2013; MÜLLER et al., 2013) estejam associados à ação sinérgica entre os compostos fenólicos. Assim, acredita-se que o extrato da casca de noz pecã, por conter vários compostos fenólicos, possa apresentar uma ação maior sobre determinadas patologias quando comparada ao uso de compostos isolados.

Embora alguns dos compostos fenólicos presentes na casca de noz pecã já tenham sido associados ao tratamento e/ou prevenção de neoplasias, ainda não foi relatado o uso do extrato da casca de noz pecã no tratamento e prevenção de tumores e cânceres. Desta forma o uso deste extrato na investigação de neoplasias torna-se interessante para avaliar, se de fato, os compostos fenólicos são capazes de agir em sinergia contra células tumorais.

## **1.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE PLANTAS**

Compostos bioativos de plantas podem ser extraídos por várias técnicas clássicas de extração. Muitas destas técnicas são baseadas em diferentes graus de extração dos solventes utilizados sozinhos ou em combinações. Dentre as técnicas mais clássicas de extração sólido:líquido é possível citar a extração por Soxhlet, maceração e hidrodestilação. No entanto, estas técnicas convencionais apresentam algumas limitações como: necessidade de períodos longos de extração, uso de solventes com alto grau de pureza e alto custo; evaporação de grandes quantidades de solventes; baixa seletividade nas extrações e



fácil decomposição de compostos termo lábeis; entre outras (STERN; KIRK, 1949; AZMIR et al., 2013).

Com os crescentes custos de energia e a movimentação para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, indústrias de alimentos e químicas à base de plantas são desafiadas a encontrar novas tecnologias, a fim de reduzir o consumo de energia, para atender às exigências legais sobre as emissões, produtos/segurança e controle dos processos, e por redução de custos, aumento da qualidade, bem como a funcionalidade (CHEMAT et al., 2017).

Portanto, novas e promissoras técnicas de extração são criadas constantemente, tais como: extração assistida por enzimas; por micro-ondas; campo elétrico pulsado; por fluido supercrítico; por líquido pressurizado; e ainda extração assistida por ultrassom (SANTANA et al., 2009).

#### **1.4.1 Extração assistida por ultrassom**

Várias classes de componentes, tais como aromas, pigmentos, antioxidantes, e outros compostos orgânicos e minerais já foram extraídos, analisados e formulados de forma eficiente a partir de um variedade de matrizes alimentares utilizando a extração assistida por ultrassom.

O ultrassom é um meio para a tecnologia alcançar o objetivo de extração química sustentável. Ele tem um efeito significativo sobre vários processos na indústria química e de alimentos. A utilização da energia de ultrassom permite a realização de extrações completas em minutos, com elevada reprodutibilidade e reduzido consumo de solventes. Desta forma, a manipulação e o processo de extração são simplificados, gerando produtos finais com pureza mais elevada, eliminando o pós-tratamento de águas residuais e consumindo apenas uma fração da energia normalmente necessária em um método de extração convencional, tal como Soxhlet, maceração ou destilação Clevenger (CHEMAT et al., 2017).

O ultrassom é um tipo especial de onda sonora encontrada nas faixas de 20 kHz a 100 MHz. O ultrassom é uma onda de natureza mecânica, logo, necessita de um meio para se propagar, isto é, a energia ultrassônica é transmitida através de um meio físico como ar ou água.

Este tipo de onda produz um fenômeno chamado de cavitação, caracterizado pela produção, crescimento e colapso de bolhas de dimensões micrométricas durante a sonicção (AZMIR et al., 2013).

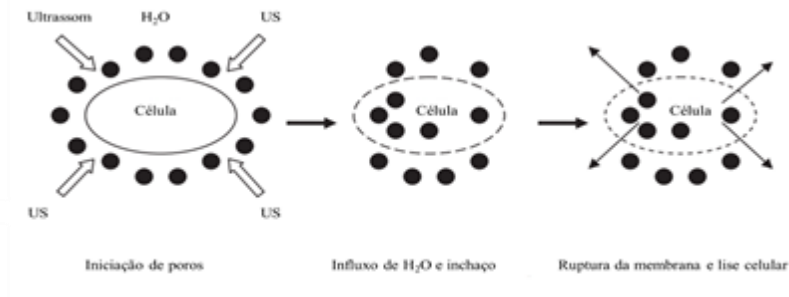
O fenômeno de cavitação acústica pode ser evidenciado quando as ondas ultrassônicas passam através de um meio líquido contendo ou não gases dissolvidos. A interação entre as ondas ultrassônicas, o líquido e o gás dissolvido conduzem a um fenômeno excitante conhecido como cavitação acústica. Durante esse fenômeno os gases dissolvidos no meio oscilam sob a influência do campo acústico devido à pressão de flutuação em torno deles. Durante as oscilações, os gases dissolvidos e o vapor do solvente difundem-se para dentro e para fora de bolhas. Nesse processo de difusão, a quantidade de gás e vapor que se difunde para as bolhas durante a fase de expansão, é maior do que a quantidade que se difunde para fora da bolha durante a fase de compressão da oscilação da bolha. Isto conduz ao crescimento das bolhas. As bolhas crescem até um tamanho máximo dentro de um ciclo de acústica e violentamente geram um colapso em condições de altas temperaturas e pressão. Como consequência, além de gerar reações químicas, a cavitação acústica também gera forças físicas violentas que incluem microjatos, forças de cisalhamento, ondas de choque e turbulência (CHANDRAPALA et al., 2012).

Vários processos, tais como congelamento, corte, secagem, endurecimento, branqueamento, esterilização, e extração têm sido aplicados eficientemente na indústria de alimentos com o uso do ultrassom. As vantagens da utilização de ultrassom para processamento de alimentos, incluem: processos de mistura e micro-mistura mais eficazes, rápida transferência de energia e de massa, temperatura reduzida, extração seletiva, redução de tamanho dos equipamentos, rápida resposta ao controle do processo de extração, aumento da produção, e eliminação de etapas dos processos. Acredita-se que processos alimentares realizados sob a ação do ultrassom podem ser afetados em parte pelos fenômenos de cavitação e aprimoramento da transferência de massa (CHEMAT et al., 2011).

A extração assistida por ultrassom é uma tecnologia potencial emergente. Ondas de ultrassom após a interação com material vegetal submetido a extração, alteram as suas propriedades químicas e físicas e seu efeito cavitacional facilita a liberação de compostos extraíveis,

melhorando o transporte de massa por perturbar as paredes celulares das plantas provocando lise celular (Figura 1.11) (CHEMAT et al., 2011).

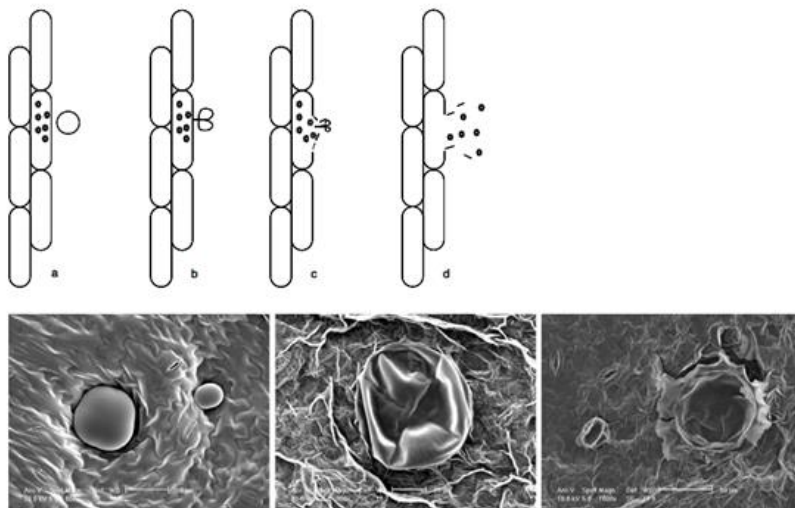
**Figura 1.11:** Mecanismo de dano à parede celular provocado pelo uso de ultrassom



Fonte: Adaptado de Chemat et al. 2011.

Isto ocorre, pois durante o processo de extração assistida por ultrassom (Figura 1.12), uma bolha de cavitação pode ser gerada perto da superfície da planta (a), em seguida, durante um ciclo de compressão e colapso de bolha (b) um microjato voltado para a matriz de planta pode ser criado (b e c). A alta temperatura e pressão envolvidos neste processo irão destruir as paredes celulares da planta matriz e o seu conteúdo pode ser libertado para o meio (d). Desta forma, esse processo torna-se uma ferramenta muito interessante para a extração de ingrediente partir de produtos naturais (CHEMAT et al., 2011).

**Figura 1.12:** Fenômeno da cavitação gerado na extração assistida por ultrassom



Fonte: Chemat et al. 2011.

Apesar do fenômeno da cavitação ser reconhecido como o mecanismo principal envolvido no uso dessa tecnologia, estudo recente revelou que a extração assistida por ultrassom não age somente através de um único mecanismo, mas de diferentes mecanismos independentes ou combinados. Em geral, vários mecanismos têm sido identificados atuando sobre o processo de extração assistida por ultrassom, dentre os quais cita-se: a fragmentação, a erosão, o efeito sobre a capilaridade, sonoporação, tensão de cisalhamento local e detexturização de estruturas das plantas. Durante a extração assistida por ultrassom, uma combinação desses efeitos provavelmente deve ocorrer. A combinação de efeitos durante o uso do ultrassom podem explicar as performances com altos rendimentos de extração de compostos de interesse da matéria-prima (CHEMAT et al., 2017).

De modo geral, observa-se como principal benefício da extração utilizando ultrassom, a obtenção de compostos de interesse em amostras sólidas, isto porque a energia do ultrassom facilita a extração de compostos orgânicos e inorgânicos a partir da lixiviação da planta matriz (HERRERA; LUQUE DE CASTRO, 2005).

## 1.5 CÂNCER


### 1.5.1 Epidemiologia do Câncer

Com o aumento da expectativa de vida dos brasileiros, as neoplasias vêm ganhando maior importância no perfil de mortalidade do país, ocupando o segundo lugar como causa de óbito e configurando-se como um problema de saúde pública (BRASIL\_Instituto Nacional de Câncer, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) através do estudo de Bray et al. (2012) divulgou uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo, e 17 milhões de mortes pela doença em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento. Sugere-se que os países em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estima-se que aproximadamente 600 mil novos casos da doença são esperados para o biênio 2016-2017. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes, retirando-se a incidência de câncer de pele não melanoma. A incidência esperada para os tipos de cânceres mais frequentes pode ser observada na Figura 1.13 (BRASIL – Instituto Nacional do Câncer, 2016).

**Figura 1.13:** Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2016.

## 1.5.2 Aspectos Gerais do Câncer

Define-se o câncer como um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica que define o câncer é a criação rápida de células anormais que crescem além de seus limites habituais, e que podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Este processo é referido como metástase, que corresponde a principal causa de morte por câncer (OMS, 2014).

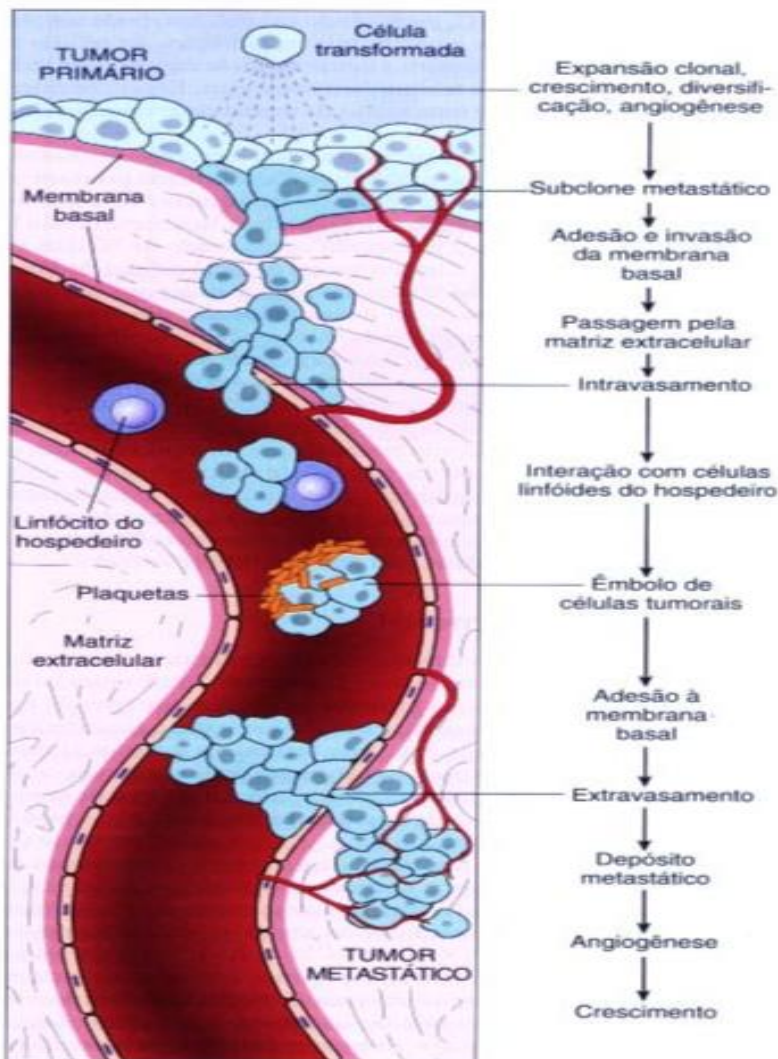
A metástase caracteriza um tumor como maligno ou benigno, uma vez que tumores benignos não metastatizam. Quando um tumor é considerado maligno, ele então pode ser denominado de câncer (COTRAN, 2000; ALBERTS, 1997). O passo inicial da metástase é a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, seguido por uma invasão local das células tumorais dentro do tecido circunvizinho. Em resumo na metástase ocorre: a liberação de células de um tumor primário; disseminação a sítios distantes presos na microcirculação de órgãos; extravasamento; infiltração dentro do parênquima dos órgãos; sobrevivência e crescimento dentro de uma nova colônia de tumor (Figura 1.14) (ENGEL et al., 2003; COTRAN, 2000).

O estadiamento de um câncer é determinado pela avaliação da extensão de sua penetração na espessura da parede (T), pela presença ou ausência de tumor nos linfonodos (metástases linfáticas) (N), e/ou pela

propagação do tumor para outros órgãos (metástases) (M), das quais os mais frequentes são fígado, pulmão e ossos (BRASIL\_Instituto Nacional de Câncer, 2003).

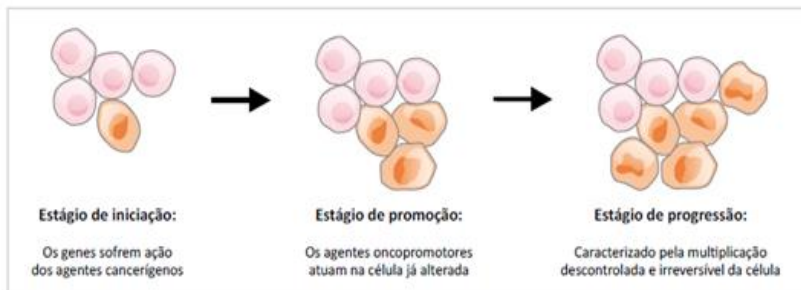
De modo geral, a carcinogênese ocorre geralmente em três fases progressivas (Figura 1.15): início, promoção e progressão do tumor. O início envolve a transformação de células pela interação de substâncias químicas, radiação ou vírus com o DNA celular. Nesta fase há uma transformação rápida, mas as células atingidas podem permanecer dormentes por períodos variáveis até serem ativadas por um agente promotor. Na promoção, as células iniciadoras multiplicam-se formando um tumor isolado. Por último, ocorre a progressão, podendo gerar uma neoplasia totalmente maligna com capacidade para invadir tecidos e criar metástases (MAHAN et al., 2012).

**Figura 1.14:** Etapas no processo de formação de metástase



Fonte: COTRAN, 2000.



**Figura 1.15:** Fases da carcinogênese

Fonte: INCA, 2013.

Para uma célula normal evoluir para uma célula de câncer metastático são necessárias múltiplas mudanças genéticas e epigenéticas. Existem pelo menos três mecanismos que permitem que uma célula sofra transformações malignas: uma mutação herdada, uma mutação somática e a metilação das células do DNA (RILEY; DESAI, 2009). Sabe-se, portanto que o metabolismo da célula cancerosa está diretamente ligado à modulação das vias de sinalização intracelulares que são interrompidas por oncogenes mutantes e genes supressores de tumores (JANG et al., 2013).

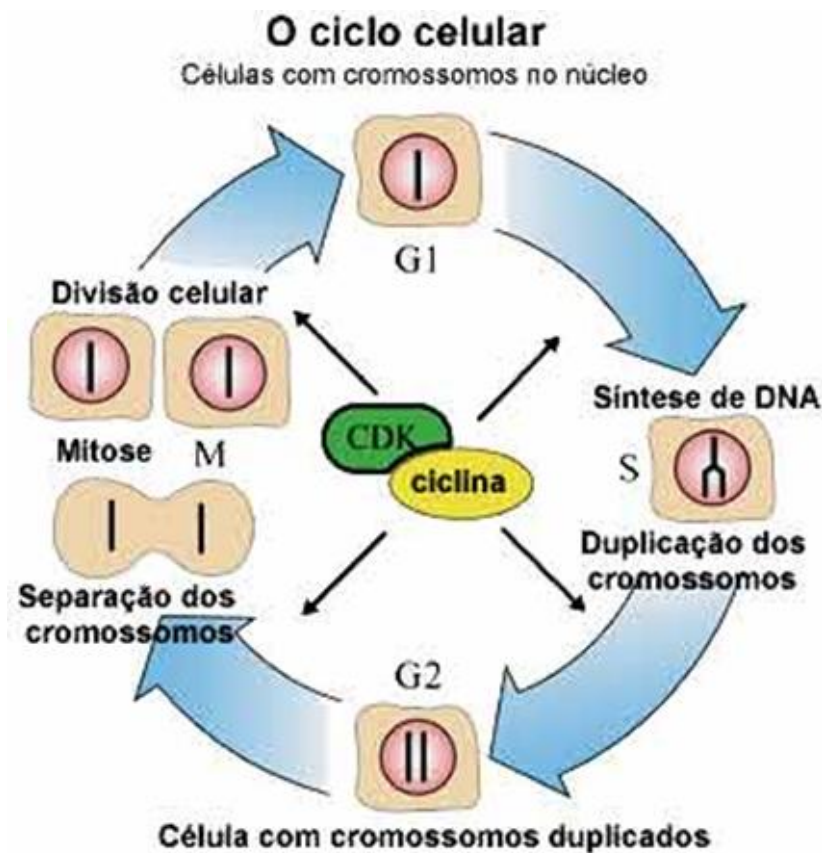
Um oncogene é um gene cuja expressão ou hiper-expressão conduz a uma transformação maligna. Genes celulares normais conhecidos como proto-oncogenes podem dar origem a oncogenes. Ao contrário, um gene supressor de tumor é aquele que inibe a transformação de uma célula normal em cancerígena. Acredita-se que a perda ou inativação de genes supressores de tumor irá libertar células de sinais de crescimento negativo levando à transformação maligna (DIAMANDIS, 1997).

As mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor permitem que a célula cancerosa cresça e se divida sem os controles impostos pelo ciclo celular. O ciclo celular é dividido em pelo menos 4 fases: G1, S, G2 e M (Figura 16). Durante as fases G1 e G2 as células estão em processo ativo de metabolização mas não se dividem. Na fase S (síntese) ocorre à duplicação de cromossomos como resultado da replicação do DNA e durante a fase M (mitose) os cromossomos duplicados se dividem em duas células filhas. As células que não estão

em processo de divisão estão na fase G0 ou fase quiescente (NORBURY; NURSE, 1992).

Assim, percebe-se que a divisão celular normal é realizada por uma complexa rede de interações entre proteínas, metabolismo e microambiente, incluindo várias vias e mecanismos de controle com o objetivo de permitir a proliferação celular apenas em resposta a estímulos específicos e em condições adequadas de sinalização. Pelo menos três fatores são considerados principais na coordenação das moléculas no ciclo celular: 1) a ativação sequencial de heterodímeros CDK-ciclina e cinases dependentes de ciclina; 2) enzimas metabólicas e metabólitos relacionados; e 3) espécies reativas de oxigênio (ROS) e o estado redox celular. O papel desses elementos-chave e da interação entre as espécies oscilatórias e não-oscilatórias revelaram-se essenciais para a condução do ciclo celular. O defeito na regulação de algum desses fatores tem sido associado ao desenvolvimento do câncer (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

**Figura 1.16:** Esquema representativo do ciclo celular normal.



Fonte: <http://www.dec.ufcg.edu.br>

### 1.5.2 Estresse oxidativo e câncer

Segundo Durackova (2010), o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, conhecidos como oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua eliminação por mecanismos de defesa, conhecidos como

antioxidantes. As consequências deste desequilíbrio geram danos a biomoléculas e células, com potencial impacto sobre todo o organismo.

Durante reações metabólicas endógenas, células aeróbias produzem as ERO, sendo o local de maior produção a mitocôndria. Alguns representantes dessas espécies são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e peróxidos orgânicos como produtos normais da redução biológica de oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1978).

A produção de ERO em linfócitos através de lipoxigenases e ciclooxigenases sugere que estas espécies também estão envolvidas no aumento da resposta imunitária e inflamação (KIM et al., 2008). Por outro lado, a produção de ERO por células não imunes está envolvida na regulação de cascatas de sinalização molecular que controlam o funcionamento celular, biossíntese de hormônios da tireoide entre outros processos (WOLIN, 2009).

Além das ERO, é postulado que em condições de hipóxia, a cadeia respiratória mitocondrial também produz óxido nítrico (NO), que pode gerar espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais, por sua vez, podem originar outras espécies como os aldeídos reativos (malondialdeído/MDA e 4-hidroxinonenal/4-HNE) por indução excessiva da peroxidação lipídica (HUSSAIN et al., 2003; POYTON et al., 2009).

Contabilizando radicais livres endógenos e exógenos, estima-se que sob condições fisiológicas normais, uma célula humana é exposta a  $1,5 \times 10^5$  lesões oxidativas por dia (VERA-RAMIREZ et al., 2011). Dentre os mecanismos de ação do estresse oxidativo em sistemas biológicos que podem contribuir para o desenvolvimento de cânceres, é possível citar a influência dos radicais livres em pelo menos três pontos: danos oxidativos ao DNA, oxidação de membranas lipídicas e oxidação de aminoácidos protéicos.

Danos ao DNA induzidos por ERO envolvem simples ou dupla quebras na molécula do DNA, modificações nas bases purina, pirimidina, ou desoxirribose, e ligações cruzadas do DNA. Esses danos ao DNA podem resultar tanto na prisão ou indução da transcrição, das vias de transdução de sinais, em erros de replicação e instabilidade genômica, todos esses sendo mecanismos associados com a carcinogênese (MARNETT, 2000).

Quanto à oxidação lipídica de membranas celulares que favorecem a carcinogênese, considera-se que o processo global da peroxidação lipídica é composto por três fases: a iniciação, a propagação e a terminação. Assim, o exemplo mais comum de ataque dos radicais livres acontece nos lipídios de membrana. Os radicais livres centrados no oxigênio (HO<sup>•</sup>) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênico alílico, convertendo-o em novo radical livre. O carbono radicalar facilmente adiciona oxigênio gerando o radical lipídio-peroxila, que pode facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo danos nas células (BARREIROS et al., 2006).

Os ataques de ERO ou ERN aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al., 2006).

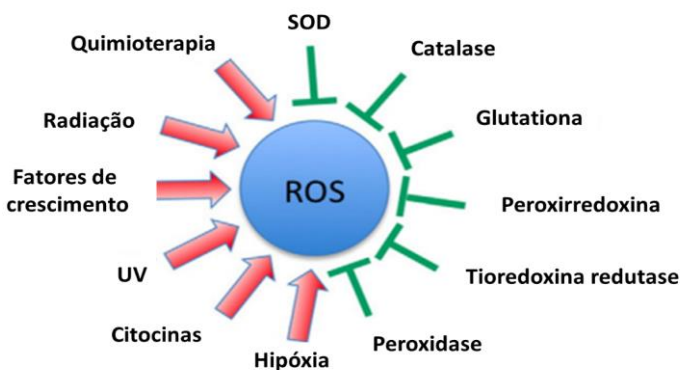
A resposta metabólica aos altos níveis de ERO, que representam alto risco de dano celular e ao DNA, é a supressão da replicação do DNA, com parada prolongada do ciclo celular que culmina no desencadeamento da apoptose (morte celular programada) (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

Neste sentido ERO também podem atuar como mecanismo de tratamento antitumoral, promovendo a parada do ciclo celular, a apoptose e a necrose, e a inibição da angiogênese. Uma vez que as células cancerosas apresentam um metabolismo acelerado, elas exigem altas concentrações de ERO para manter as altas taxas de proliferação. Desta forma, o estresse oxidativo intrínseco associado com a transformação oncogênica pode tornar as células tumorais fortemente dependentes dos seus sistemas antioxidantes para manter o equilíbrio redox e, portanto, vulneráveis a agentes que prejudicam a capacidade antioxidante. A inibição do sistema antioxidante em células tumorais levaria a um grande acúmulo de ERO, levando à morte da célula. O acúmulo de ERO em células tumorais, portanto estaria causando dano oxidativo às membranas das mitocôndrias e prejudicando a integridade das mesmas e levando a morte maciça das células (TRACHOOTHAM et al., 2006; SOSA et al., 2013).

Autores ainda afirmam que os danos provocados pelos níveis aumentados de EROS em células tumorais estão diretamente relacionados aos níveis e duração do estresse (TRACHOOTHAM et al., 2006). Estes efeitos dose e tempo dependentes permitem explorar a potencial morte celular por EROS por meio de agentes exógenos que aumentem as espécies intracelulares a níveis tóxicos que provoquem a morte das células tumorais. Considerando que em células normais a geração e EROS para o equilíbrio redox é menor quando comparada as células tumorais, esta diferença bioquímica entre células normais e tumorais pode constituir uma base para a modulação de EROS celular como uma estratégia para suprimir seletivamente as células cancerosas.

O sistema antioxidante envolvido tanto no balanço redox de células normais como de células tumorais, é constituído de antioxidantes enzimáticos como por exemplo, superóxido-dismutase (SOD), glutaciona-peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e catalase (CAT). Também fazem parte do complexo antioxidantes não enzimáticos como a glutaciona (GSH) e vitaminas C e D (REUTER et al., 2010). Diante do exposto acima, tem-se que para células normais tal sistema preferencialmente deve estar aumentado para garantir as defesas contra o ataque de EROS às células. Em contraste, a supressão desse sistema permitiria a destruição seletiva de células tumorais implantadas.

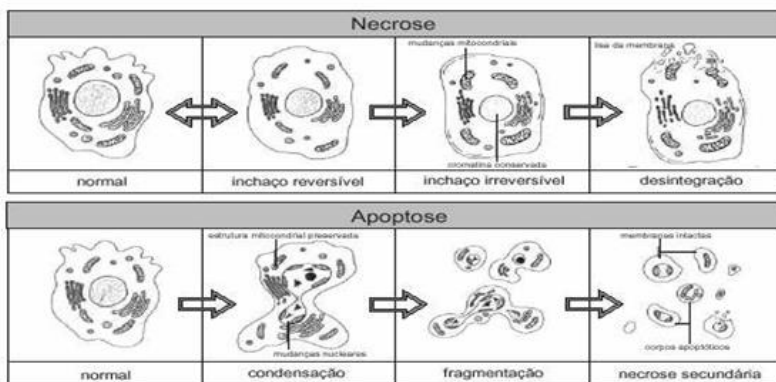
**Figura 1.17:** Esquema representativo de vários ativadores e inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio



### 1.5.3 Morte celular tumoral

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, necrose e mitose catastrófica. Sendo a apoptose e a necrose (Figura 1.18) os tipos de morte celular mais estudados em processos tumorais.

**Figura 1.18:** Alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose e necrose.



O termo "morte celular programada" foi proposto para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Kerr et al. (1972) sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular.

O processo apoptótico é caracterizado por uma retração da célula responsável por perda de adesão com a matriz extracelular e com as células adjacentes. Durante o processo, as organelas celulares conservam a morfologia, a cromatina condensa e se concentra junto da membrana nuclear. A formação de "blebs" (prolongamentos) pela membrana celular desintegra o núcleo e transforma-o em fragmentos envoltos pela membrana nuclear, porções também conhecidas como corpos apoptóticos que por sua vez são fagocitados por macrófagos e removidos sem desencadear um processo inflamatório (ZIEGLER, 2004).

Em relação aos fatores que podem desencadear a apoptose podem ser citados especialmente a ligação de moléculas à receptores de membrana, quimioterápicos, radiação ionizante, choque térmico, privação à fatores de crescimento, falta de nutrientes, danos no DNA e altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Esta ativação pode ocorrer pela via extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), sendo que esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. Já a via intrínseca é ativada quando ocorre estresse intra- ou extracelular como por exemplo pela ativação de oncogenes, que desencadeiam sinais para a mitocôndria, a qual libera moléculas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000; GRIVICICH et al., 2007).

Várias proteases participam dos processos de indução da morte celular, as mais conhecidas são as caspases. A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose. Isso significa que a ação destas enzimas representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer. Com relação à regulação da morte por apoptose, sabe-se que níveis elevados dos genes Bcl-2 e Bcl-x bloqueiam a apoptose enquanto que Bax, Bad e Bak são capazes de promover a apoptose. O mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular. Um outro importante gene envolvido no processo de morte e proliferação celular é o supressor tumoral p53. Este gene é o mais frequentemente mutado em todos os tipos de câncer humano e é um sensor universal de estresse genotóxico. O gene p53 paraliza o ciclo celular desencadeando a apoptose. Por impedir a proliferação de células mutadas, protegendo o organismo do câncer, o p53 é denominado de gene supressor de tumores (GRIVICICH et al., 2007).

Já a necrose é um tipo de morte celular que não está programada, ou seja, ocorre de forma acidental. Em contraste com a apoptose, a necrose é uma forma passiva de morte celular. A morfologia de células que morrem por necrose é bastante diversificada. De modo geral, a membrana da célula torna-se permeável mais cedo durante o processo de morte, organelas podem dilatar-se, e ribossomos podem dissociar-se do



retículo endoplasmático. O núcleo se desintegra tardiamente, e em alguns casos ocorre a condensação da cromatina. No entanto, as células necróticas não conseguem manter a integridade da membrana plasmática, extravasando seu conteúdo e podendo causar inflamação no tecido adjacente (HENGARTNER, 2000).

#### **1.5.4 Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)**

Muitos dos conhecimentos a respeito da relação tumor – sistema imunológico derivam, principalmente, de observações em modelos experimentais utilizando neoplasias transplantáveis em animais, especialmente camundongos. Uma neoplasia que vem sendo muito utilizada como modelo experimental é o tumor de Ehrlich. Este tumor foi introduzido na oncologia experimental por Paul Ehrlich em 1906, sendo um dos primeiros tumores transplantáveis descritos na literatura. O tumor de Ehrlich é reconhecido como um tumor mamário espontâneo, de camundongo fêmea, originário de um carcinoma. O crescimento deste tumor se faz de duas formas: a forma sólida, quando as células tumorais são inoculadas no tecido subcutâneo ou na veia dos animais e crescem em diferentes locais do organismo, e a forma ascítica (FECCHIO et al., 1990).

A forma sólida do tumor de Ehrlich é caracterizada por extensas áreas de necrose oriundas da morte de células neoplásicas. Nota-se que nesta forma, o tumor apresenta poucas células inflamatórias, estroma escasso e alto índice mitótico e de invasibilidade (VERÇOSA-JUNIOR et al., 2007).

Quanto à forma ascítica, foi introduzida em 1932 por Loewenthal e Jahn que observaram que quando as células eram transplantadas na cavidade peritoneal, cresciam em suspensão, formando ascites. Surgia, então, o tumor ascítico de Ehrlich, que é mantido por meio de passagens intraperitoneais (FECCHIO et al., 1990). Após aproximadamente sete dias de inoculação do tumor na cavidade peritoneal, o exame macroscópico revela a presença de grande quantidade de fluido levemente viscoso e de aspecto leitoso. Após 10 dias da inoculação, cerca de 90% das células peritoneais são células tumorais (VERÇOSA-JUNIOR et al., 2007)

Devido a fácil manipulação e transplante em camundongos, o tumor ascítico de Ehrlich é muito utilizado para o estudo da ação biológica de extratos de plantas e outras substâncias como possíveis alternativas terapêuticas contra carcinomas (QUEIROZ et al., 2004).

### 1.5.5 Tratamento do câncer

O tratamento do câncer tradicionalmente é realizado de três formas. Pode-se optar pela intervenção cirúrgica, pela quimioterapia ou pela radioterapia. Em alguns casos recorre-se a combinação destas modalidades de tratamento (INCA, 2014).

Embora muitas vezes eficazes, os tratamentos convencionais do câncer caracterizam-se por não serem específicos, atacando também as células normais além das células tumorais. Desta forma, estas terapias apresentam diversos efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, em alguns casos, os fármacos disponíveis não são totalmente eficazes e o uso de associações faz-se necessária, aumentando ainda mais os efeitos colaterais.

Assim, a busca por novas substâncias com efeito terapêutico tem aumentado, com intuito de elevar a especificidade dos fármacos antitumorais. O uso de extratos de plantas pode representar uma alternativa nesta busca relacionada à eficácia e segurança dos tratamentos. E ainda, por apresentarem diversas substâncias em sua composição, o uso de extratos pode configurar-se também como opção de uso preventivo ao desenvolvimento de tumores.

## REFERÊNCIAS

ABIB, R. T.; PERES, K. C.; BARBOSA, A. M.; et al. Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2618–2623, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.006>>.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Células*. 3ªed. Porto Alegre, **Artes Médicas**, p. 963-1006, 1997.

AMBRÓSIO, E. **Efeitos metabólicos do Café na Diabetes Mellitus Tipo 2**. 2010.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>>. .

BAEK, S. J.; KIM, J.-S.; JACKSON, F. R.; et al. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 12, p. 2425–2432, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BENVEGNÚ, D.; BARCELOS, N.; BOUFLEUR, N.; et al. Protective Effects of a By-Product of the Pecan Nut Industry ( *Carya illinoensis* ) on the Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats *Carya illinoensis* Protects Against Cyclophosphamide- Induced Toxicity. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 29, n. 3, p. 185–197, 2010.

BENVEGNO, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; ROVERSI, K.; et al. Aqueous extract of pecan nut shell (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) exerts protection against oxidative damage induced by cyclophosphamide in rat testis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 32, n. 4, p. 329–341, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579785>>.

BERNAL, P.; LEMAIRE, S.; PINHO, M. G.; et al. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated -lactam resistance by delocalizing PBP2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 24055–24065, 2010.

BERNHAUS, A.; FRITZER-SZEKERES, M.; GRUSCH, M.; et al. Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 274, n. 2, p. 299–304, 2009. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.020>>. .

BHARDWAJ, P.; KHANNA, D. Green tea catechins: Defensive role in cardiovascular disorders. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 4, p. 345–353, 2013. China Pharmaceutical University. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60051-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60051-5)>. .

BRASIL - Instituto Brasileiro Geografia e Estatística. Estados@ - **Lavouras Permanentes 2012**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acessado em: abril 2014.

BRASIL – Instituto Nacional de Câncer. **A situação do câncer no Brasil**/Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

BRASIL - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRASIL - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Tratamento do Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BRASIL. – Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre Câncer do Intestino** Instituto Nacional de Câncer, Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Br. 2003.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y farmacognosia**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1991, 1 ed., 594 p.

CAYMAN CHEMICAL COMPANY. **(-)-Epicatechin Gallate: Cayman Chemical Item Number 11808**. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/app/template/>>. Acessado em junho 2014.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 975–983, 2012.

CHEMAT, F.; HUMA, Z. E; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813–835, 2011.

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

CHEN, K. S.; HSIAO, Y. C.; KUO, D. Y.; et al. Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. **Leukemia Research**, v. 33, n. 2, p. 297–307, 2009.

CHO, A. S.; JEON, S. M.; KIM, M. J.; et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937–943, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>>.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T.R. Patologia Estrutural e Funcional. 6ªed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p233-293, 2000.

DE-MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Metodos para analise de acido clorogenico. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 586–592, 2004.

DIAMANDIS, E. P. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 257, n. 2, p. 157–180, 1997.

DIAZ-MORALLI, S.; TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A.; CASCANTE, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–71, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813000235>>.

DIVINUT. **Saúde, sabor e requinte**. Disponível em: <[www.divinut.com.br](http://www.divinut.com.br)>. Acessado em: maio de 2014.

DURACKOVA, Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. , v. 8408, p. 459–469, 2010.

ENGEL, J.; ECKEL, R.; KERR, J.; et al. The process of metastasisation for breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 12, p. 1794–1806, 2003.

EYLES, A., DAVIES, N.W., MITSUNAGA, T., MIHARA, R., MOHAMMED, C. Role of *Eucalyptus globulus* wound wood extractives: evidence of superoxide dismutase-like activity. **Forest Pathol.** v.34, p. 225–232, 2004.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125–132, 1990.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**. v. 8;201(4359): p. 875-80. 1978

GARDEA BÉJAR, A.A., MARTÍNEZ TÉLLEZ, M.A., YAHIA, E.M. 2011. Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.) .143 - 162. Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Yahia, E.M. (ed). **Woodhead Publishing**. Cambridge, UK.ISBN:978-0-85709-090-4.

GICHNER, T.; POSPÍŠIL, F.; VELEMÍNSKÝ, J.; VOLKEOVÁ, V.; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella Assay. **Folia Microbiologica**, v. 32, n. 1, p. 55–62, 1987.

GOLUMBIC, C. A. L. V. I. N.; MATTILL, H. A. The Antioxidant Properties of Gallic Acid and Allied Compounds. **J. Am. Oil Chem Soc.**, v. 19, p. 144–145, 1942.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343,

2007. Disponível em:  
<[http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_53/v03/pdf/revisao4.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf)>.
- HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–6, 2000. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048727>>.
- HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 1, p. 1–7, 2005.
- HO, H.-H.; CHANG, C.-S.; HO, W.-C.; et al. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF- $\kappa$ B activity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 266, n. 1, p. 76–85, 2013. Elsevier Inc. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153558>>. Acesso em: 18/12/2014.
- HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 4, p. 276–285, 2003.
- INDERJIT; NILSEN, E. T. Bioassays and Field Studies for Allelopathy in Terrestrial Plants: Progress and Problems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3–4, p. 221–238, 2003.
- JANG, M.; KIM, S. S.; LEE, J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 10, p. e45, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em:  
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3809361&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- JI, L.; JIANG, P.; LU, B.; et al. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1911–1919, 2013.

Elsevier Inc. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.007>>.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. Journal Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KIM, H. S.; QUON, M. J.; KIM, J. A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 187–195, 2014. Elsevier. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>>.

KIM, S. H.; KANG, K. A.; ZHANG, R.; et al. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1319–1326, 2008.

KIM, D.O., LEE, K.W., LEE, H.J., LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolic phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p. 3713–3717, 2002.

KONDO, T.; OHTA, T.; IGURA, K.; HARA, Y.; KAJI, K. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. **Cancer Letters**, v. 180, n. 2, p. 139–144, 2002.

KÜRBITZ, C.; HEISE, D.; REDMER, T.; et al. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. **Cancer Science**, v. 102, n. 4, p. 728–734, 2011.

LIM, Y. C.; LEE, S. H.; SONG, M. H.; et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 18, p. 3260–3266, 2006.

LIMA, S. S. **O Cultivo de Noz Pecã no Município de Itaqui-RS: O Estudo de Caso do Sítio Parintins**. 2011.



MA, J.; LUO, X. D.; PROTIVA, P.; et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 983–986, 2003.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 2012.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 361–370, 2000.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. In: **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 36(1), p. 1-11, 2002.

MIRVISH, S.S., CARDESA, A., WALLACAVE, L., SHUBIK, P., 1975. Induction of mouse lung adenomas by amines or ureas plus nitrite and by N-nitroso compounds: effect of ascorbate, gallic acid, thiocyanate and caffeine. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 55, p. 633–666, 1975.

MÜLLER, L. G.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; et al. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1–2, p. 165–171, 2013. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.08.002>>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID=323**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/323> (accessed Sept. 12, 2017).

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database; CID=637542**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637542> (accessed Sept. 12, 2017)

NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annual review of biochemistry**, v. 61, p. 441–70, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1497317>>.

NPSA – National Pecan Shellers Association. **History of Pecans**. Disponível em: < <http://www.ilovepecans.org/pecans-101/history-of-pecans/>>. Acessado em: abril 2014.

OMS\_Organização Mundial da Saúde. **Health topics: cancer**. 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acessado em: Abril de 2016.

ORO, T.; OGLIARI, P. J.; AMBONI, R. D. D. M. C.; ARELLANO, D. B.; BLOCK, J. M. Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [ *Carya illinoensis* ( Wangenh .) C . Koch ] acondicionadas en diferentes envases. **Grasas y Aceites**, v. 59, n. 2, p. 132–138, 2008.

PORTO, L. C. S.; SILVA, J. DA; FERRAZ, A. D. B. F.; et al. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 579–85, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831307>>. Acesso em: 7/1/2015.

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 332–340, 2009.

PRADO, A. C. P. DO. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz pecã** [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch], 2008. Federal University of Santa Catarina - Brazil.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 5, p. 458–467, 2009. Disponível em: <<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/582/596>>. Acesso em: 7/1/2015.

PRADO, A. C. P.; MANION, B. A.; SEETHARAMAN, K.; et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition

of the oil and the shell of pecan nuts [ *Carya illinoensis* ( Wangenh ) C . Koch ]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64–73, 2013.

PRADO, A. C. P.; SILVA, H. S.; SILVEIRA, S. M.; et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [ *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops & Products**, v. 52, p. 552–561, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.031>>.

QUEIROZ, M. L.; VALADARES, M. C.; BINCOLETTO, C.; DIEAMANT, G. C. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 26, n. February, p. 511–25 ST–Ehrlich ascites tumor as a tool in th, 2004.

RAMALHO, S. A.; NIGAM, N.; OLIVEIRA, G. B.; et al. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 155–161, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912005005>>. Acesso em: 18/11/2014.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em oleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice : Beneficial effects of pecan nut shells extract , a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safaty**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>>.

RILEY, L. B.; DESAI, D. C. The Molecular Basis of Cancer and the Development of Targeted Therapy. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n. 1, p. 1–15, 2009.

ROY, S.; SANNIGRAHI, S.; GHOSH, B.; PUSP, P.; ROY, T. Combination therapy of dexamethasone with epigallocatechin enhances tibiotarsal bone articulation and modulates oxidative status correlates with cartilage cytokines expression in the early phase of experimental arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 444–454, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.004>>.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; et al. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 861–880, 2002.

SEIDEL, C.; SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. **Cancer Letters**, v. 343, n. 1, p. 134–146, 2014. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.026>>.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC-Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 741, n. 2, p. 223–231, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967396001690>>.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**. Versão 5.4, 2014. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/>>. Acessado em junho de 2014.

SISWANTO, F.M., OGURO, A., IMAOKA, S. Chlorogenic acid modulates hypoxia response of Hep3B cells. **Personalized Medicine Universe**, v. 6, p. 12-16, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 985–1015, 2005.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 200–213, 2005.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>>.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 753–758, 2003.

TRACHOOTHAM, D.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v. 10, n. 3, p. 241–252, 2006.

TREVIZOL, F.; BENVIGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 13–18, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.026>>.

USDA- United States Department of Agriculture. Pecan *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch – **Plant Fact Sheet**. October, 2010.

USDA- United States Department of Agriculture. *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=cail2>>. Acessado em: abril de 2014.

VENKATACHALAM, M. **Chemical Composition of Select Pecan [ *Carya illinoensis* ( Wangenh .) K . Koch ] Varieties and Antigenic Stability of Pecan Proteins**, 2004. Florida State University.

VERA-RAMIREZ, L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; et al. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 3, p. 347–368, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.01.004>>.

VERÇOSA-JUNIOR, D.; MELO, M. M.; CASSALI, G. D.; DANTAS-BARROS, A. M.; SILVA-JUNIOR, P. G. P. Influência de *Agaricus blazei Murrill* sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundogos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 150–154, 2007.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473–485, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011>>.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241–1249, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606005796>>. Acesso em: 18/12/2014.

WOLIN, M. S. Reactive oxygen species and the control of vascular function. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 296, n. 3, p. H539–H549, 2009.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), Pecan technology . **New York: Chapman & Hall**, p. 39 – 45, 1994.

YAN, Y., LIU, N., HOU, N., DONG, L., LI, J. Chlorogenic acid inhibits hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 46, p. 68–73, 2017.

YEN, G. C.; DUH, P. DER; TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307–313, 2002.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1356–1362, 2010.

ZIEGLER, U. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 124–128, 2004.





**CAPITULO 2: EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM  
COMBINADA COM A PREPARAÇÃO E ANÁLISE DA  
AMOSTRA USANDO LC-ESI-MS/MS PERMITIU A  
IDENTIFICAÇÃO DE 24 COMPOSTOS FENÓLICOS NOVOS  
EM EXTRATOS DA CASCA DE NOZ PECÃ [*Carya illinoensis*  
(Wangenh) C. Koch]**

Ultrasonic-assisted extraction combined with sample preparation and analysis using LC-ESI-MS/MS allowed the identification of 24 new phenolic compounds in pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] extracts.

**RESUMO**

Extração assistida em ultrassom combinada com ferramentas estatísticas (design fatorial, metodologia de superfície de resposta e cinética) foram utilizados para avaliar os efeitos das condições experimentais de temperatura, razão sólido:solvente, concentração de etanol e de tempo para a extração do conteúdo fenólico total da casca de noz pecã. As condições ótimas para o extrato aquoso e hidroalcoólico (com etanol a 20% v/v) foram 60 e 80 °C; razão sólido:solvente de 30 mL/g (para ambos) e tempo de extração de 35 e 25 minutos, respectivamente. Usando estas condições de extração, 426 e 582 mg GAE/g de compostos fenólicos foram obtidos no extrato aquoso e hidroalcoólico, respectivamente. Além disso, a análise dos compostos fenólicos utilizando o sistema LC-ESI-MS / MS permitiu a identificação de 29 compostos fenólicos, 24 dos quais ainda não foram relatados na literatura para esse vegetal.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos, extração assistida em ultrassom, extrato da casca de noz de pecã, atividade antioxidante, LC-ESI-MS/MS, perfil fenólico.

**Ultrasonic-assisted extraction combined with sample preparation and analysis using LC-ESI-MS/MS allowed the identification of 24 new phenolic compounds in pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] extracts**

**ABSTRACT**

Ultrasonic-assisted extraction combined with statistical tools (factorial design, response surface methodology and kinetics) were used to evaluate the effects of the experimental conditions of temperature, solid-to-solvent ratio, ethanol concentration and time for the extraction of the total phenolic content from pecan nut shells. The optimal conditions for the aqueous and hydroalcoholic extract (with 20 % v/v of ethanol) were 60 and 80 °C; solid to solvent ratio of 30 mL.g<sup>-1</sup> (for both) and extraction time of 35 and 25 minutes, respectively. Using these optimized extraction conditions, 426 and 582 mg GAE.g<sup>-1</sup> of phenolic compounds, from the aqueous and hydroalcoholic phases respectively, were obtained. In addition, the analysis of the phenolic compounds using the LC-ESI-MS/MS system allowed the identification of 29 phenolic compounds, 24 of which had not been reported in literature for this raw material yet.

**Keywords:** phenolic compound, ultrasonic-assisted extraction, pecan nut shell extract, antioxidant activity, LC-ESI-MS/MS, phenolic profile.

**Chemical compounds**

Chemical compounds studied in this article:

Salicylic acid (PubChem CID:338); P-anisic (PubChem CID:7478); Mandelic acid (PubChem CID:1292); Vanillin (PubChem CID: 1183); Protocatechuic acid (PubChem CID: 72); P-coumaric acid (PubChem CID:637542); Vanillic acid (PubChem CID:8468); Gallic acid (PubChem CID: 370); 4-methylumbelliferone (PubChem CID:5280567); Ferulic acid (PubChem CID:445858); Silyngic (PubChem CID:10742); Sinapaldehyde (PubChem CID:5280802); Resveratrol (PubChem CID:445154); Apigenin (PubChem CID:5280443); Galangin (PubChem CID:16131409); Naringerin (PubChem CID:42607905); Eriodictyol (PubChem

CID:440735); Aromadendrin (PubChem CID:122850); Fustin (PubChem CID:5317435); Catechin (PubChem CID:73160); Epicatechin (PubChem CID:72276); Ellagic acid (PubChem CID:5281855); Quercitin (PubChem CID:5280343); Taxifolin (PubChem CID:439533); Myricetin (PubChem CID:5281672); Chlorogenic acid (PubChem CID:1794427); Rosmarinic acid (PubChem CID: 5281792); Epicatechin gallate (PubChem CID:107905); Epigallocatechin (PubChem CID:72277).

## 1. INTRODUCTION

Antioxidant activity (*in vitro* and *in vivo*), anticarcinogenic, antimicrobial, antiviral, antidiabetic and hepatoprotective effects have been widely reported for phenolic compounds extracts from different raw materials (LAMPE, 2003; VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007; PRADO et al., 2009a, 2013; BENVEGNÚ et al., 2010; ABDALLAH et al., 2011; TREVIZOL et al., 2011; RECKZIEGEL et al., 2011; BENVEGNU et al., 2013; MÜLLER et al., 2013; BASGEDIK et al., 2014; KALIORA et al., 2014; HILBIG et al., 2017). The biological effects observed for the phenolic compounds make them interesting for incorporation as a functional ingredient in foods, cosmetics and medicines. The extraction of these compounds from by-products generated by the food industry can add value to materials considered as waste.

Pecan nut shells [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch], which represent between 40 and 50% of waste generated from the processing of nuts, are rich in phenolic compounds (VILLARREAL-LOZOYA et al., 2007; PRADO et al., 2009a; PORTO et al., 2013; WORLEY, 1994)

A few phenolic compounds such as ellagic acid, gallic acid, chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, epigallocatechin and epicatechin-gallate have been reported in pecan nut shell extract (ROSA et al., 2011; BENVEGNU et al., 2013; PORTO et al., 2013; PRADO et al., 2014). The extraction of phenolic compounds from pecan nut shell may be difficult because they can bound to the matrix components such as cellulose and lignin. Furthermore, extraction conditions as the pH of solution, temperature, time, solvent concentration, pressure and the

power nut shell particle may contribute to the efficiency of extraction (JUNTACHOTE et al., 2006).

Long time of extraction and high consumption of solvent are involved in traditional extraction methods such as soxhlet extraction, maceration and hydro distillation. In this case, phenolic compounds also may suffer oxidation, hydrolysis and ionization of the molecules. The extraction of phenolic compounds using ultrasound energy has been used as an alternative to reduce these disadvantages (LI et al., 2005). In addition, in solid matrices the ultrasound energy can leach the bioactive compounds of interest and increasing the yield of extraction (HERRERA; LUQUE DE CASTRO, 2005; CHEMAT et al., 2008).

The extraction of phenolic compounds from pecan nut shell using an ultrasound assisted method has not been reported in the literature and due to the complexity of the matrix, difficulties in extraction and analysis procedures it is believed that this sample may have more phenolic compounds which have not been identified. In this study, the ultrasound-assisted extraction with statistical tools such as factorial design, response surface methodology, extraction kinetics and analysis using LC-ESI-MS/MS were combine in order to determine optimal operating conditions for efficient extraction and also the identification and quantification of phenolic compounds from such a complex matrix.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 SAMPLE PREPARATION**

Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shells of the Barton variety harvested in 2013 provided by EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural - Technical Assistance and Rural Extension Company, Brazil) were used in this study.

The shells were dried at 40 °C for 1 hour to reduce their moisture content, milled and sieved to a 60 mesh size (PRADO et al., 2009c) and then the powder was toasted at 100 °C for 1 hour before analysis (RODRIGUES et al., 2008).

## 2.2 CHEMICAL REAGENTS

Folin-Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Trolox [(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid] and vanillin were obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Others chemical reagents, solvents and standards used in the experiment were of analytical grade (P.A.) and obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The standards were prepared as a stock solution (1000 mg/L in methanol 100%), stored in a freezer and used to prepare the calibration curves by appropriate dilution from the mixture.

## 2.3 ULTRASOUND EXTRACTION

The extraction process of the shells was carried out in an ultrasonic cleaning bath (EGS 5HD model, 40 kHz, 300 W, Enge Solutions®, São Paulo, SP, Brazil). The powder of pecan nut shell (1.0 g) was placed into Erlenmeyer flasks, the solvent (water and ethanol) was added and sonicated for 60 minutes. After sonication, the extracts were filtered, evaporated in a rotary evaporator (60 °C/60 rpm) and packed in amber bottles under a nitrogen atmosphere and stored at -24 °C for further analysis.

## 2.4 EXPERIMENTAL DESIGN

The extraction temperature, the solvents concentration and the solid-to-solvent ratio were tested under different conditions. A three-level-two-factor and four central point factorial design was employed for the extraction of phenolic compounds from the aqueous phase requiring a total of 12 experiments. A three-level-three-factor and five central point factorial design was employed for the extraction from the hydroalcoholic phase, requiring a total of 22 experiments. The process variables tested and their variation ranges were: temperature (60–80 °C), solid-to-solvent ratio (30–50 mL), and ethanol concentration (20–80 %, v/v) (Table 2.1).

**Table 2.1:** Level of coded and real values for factorial design.

Factors	Level		
	-1	0	1
Extraction temperature (°C) ( $X_1$ )	60	70	80
Solid-to-solvent ratio (mL.g <sup>-1</sup> ) ( $X_2$ )	30	40	50
Ethanol concentration (% , v/v) ( $X_3$ )	20	50	80

The experiments were performed according Table 2.2. The experimental data were described by the fitting model equation:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n A_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where  $Y$  is the dependent variable;  $A_0$  the regression coefficient,  $A_i$  the linearity,  $A_{ii}$  the squared effect, and  $A_{ij}$  the interaction effect; and  $X_i$  and  $X_j$  the independent variables.

The results were analysed using Statistica software (7.0 version). F test was used for the coefficient interpretation. The analysis of variance (ANOVA), regression analysis and the plot of the response surface that correlate the total phenolic content with the evaluated factors (temperature, solid-to-solvent ratio and ethanol concentration) were performed.

## 2.5 KINETIC OF EXTRACTION

The factorial design and the response surface plots were used to find the best temperature (60 °C and 80 °C for aqueous and hydroalcoholic extracts, respectively) and the solvent-to-solid ratio (30 mL.g<sup>-1</sup> for both extracts). These parameters were used to determine the extraction time with the highest yield for phenolic compounds extracted from pecan nut shells. For each extraction phase, three repeated extractions were carry out. Duplicate samples were collected every 2 min during the first 10 min, and every 5 min from 10 to 100 min. The phenolic compounds were determined in all samples collected.

## 2.6 DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT (TFC)

The total phenolic content was determined following PRADO et al. (2009b) and BUDINI et al.(1980) protocols, using the Folin-Ciocalteu colorimetric method. Briefly, aliquots of 0.1 mL of appropriate dilution of the extracts ( $2.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) were shaken for 1 min with 0.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent in volumetric flasks (10 mL). The reaction was neutralized with 1.5 mL of saturated sodium carbonate ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ) and the volume of each flask was completed with deionized water. The samples were incubated for 2 h at room temperature and protected from the light. Finally, the absorbance of the solution was determined at 764 nm using glass cuvettes in a spectrophotometer (SP 2000 UV, Bel Photonics®, Piracicaba, São Paulo, Brazil). For the quantification, a standard curve of gallic acid ( $50 - 1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) was used and the results were expressed as Gallic Acid Equivalent (mg gallic acid/g of defatted pecan nut shell – GAE/g of sample). Data are reported as means  $\pm$  SD for three replications.

## 2.7 DETERMINATION OF CONDENSED TANNINS (CT)

The determination of condensed tannins (CT) was carried out according to the protocol of PRICE et al. (1978), adapted by VILLARREAL-LOZOYA et al. (2007). 1 ml aliquots of extracts ( $2.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) were placed into test tubes and 5 mL of vanillin reagent (0.5 g of vanillin and 200 mL of 4 % HCl in methanol) was added. The blank sample followed the same procedure without the vanillin. The tubes were incubated in the dark for 20 minutes and the absorbance was measured at 500 nm using glass cuvettes in a spectrophotometer (SP 2000 UV, Bel Photonics®, Piracicaba, São Paulo, Brazil). A standard curve of catechin solution ( $0 - 1200 \text{ mg.L}^{-1}$ ) was used for the quantification and the results, which were expressed as mg catechin equivalents. $\text{g}^{-1}$  of sample (mg CE. $\text{g}^{-1}$  of sample).

## 2.8 ANTIOXIDANT ACTIVITY (AA)

### 2.8.1 ABTS assay

ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid)] assay was carried out the protocol of RE et al. (1999) with some modifications. A ABTS<sup>•+</sup> radical solution was prepared mixing equal volumes of a ABTS stock solution (7 mM in water) with potassium persulfate (2.45 mM) which was then incubated for 12–16 h at room temperature in darkness. For the sample analysis, the ABTS<sup>•+</sup> radical solution was adjusted with ethanol to achieve an absorbance value of  $(0.700 \pm 0.02)$  at 754 nm ( $A_{754} = A_0$ ). Then 20  $\mu\text{L}$  of extracts stock solutions (50, 125, 250 and 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were added in 980  $\mu\text{L}$  of adjusted ABTS<sup>•+</sup> solution and incubated for 6 minutes. The absorbance of the reaction was measured at 754 nm ( $A_{754} = A_f$ ) using glass cuvettes. A standard curve of Trolox stock solution (190, 390, 590, 790, 1000 and 1181  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was used to quantify the results, which were expressed as  $\mu\text{mol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry weight ( $\mu\text{mol Trolox equivalent antioxidant capacity}\cdot\text{g}^{-1}$  of sample).

### 2.8.2 DPPH assay

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was carried out as in the protocol of MENSOR et al. (2001). One mL of a 0.3 mM DPPH ethanol solution was added to 2.5 mL of extracts solutions having the concentration of 250, 125, 62.5, 25, 12.5, 5 and 2.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in multiple samples, and the solutions were incubated for 30 min at room temperature. Ethanol (1.0 mL) plus pecan nut shell extract solution (2.5 mL) was used as the blank, while a DPPH solution (1.0 mL; 0.3 mM) plus ethanol (2.5 mL) was used as a negative control. The antioxidant activities (AA) were determined by measuring the absorbance at 518 nm and using the following Eq. 2:

$$\text{AA\%} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) * 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right\} \quad (2)$$

For the quantification a standard curve of Trolox stock solution (190, 390, 590, 790, 1000 and 1181  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was used and the results



were expressed as  $\mu\text{mol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry weight ( $\mu\text{mol Trolox}$  equivalent antioxidant capacity $\cdot\text{g}^{-1}$  of sample).

## 2.9 PHYTOCHEMICAL ANALYSIS

### 2.9.1 Samples preparation

Samples preparation was performed as described by SCHULZ et al. (2015) with some modification. The dried extracts (0.5 g) were subjected to acid hydrolysis using 5 mL of methanol and 5 mL of hydrochloric acid in an oven (model 400 / D200 ° C, New Ethics®) at 85 °C for 30 min. The solution was then adjusted to pH 2 with NaOH, partitioned with 10 mL of ethyl ether and centrifuged at 3000 g for 10 min. Finally, the supernatants were combined, the organic solvent removed using a rotary evaporator and the dried extract was resuspended in methanol (1mL).

### 2.9.2 Analysis of the phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS

The method proposed by SCHULZ et al. (2015) was used to identification and quantification of phenolic compounds as described below. The standards and samples were injected into a water: methanol (70:30) mixture (10  $\mu\text{L}$ ) in a chromatographic equipment consisting of a high performance liquid chromatography (LC) system (Agilent Technologies, Germany) and the separation was performed in a Synergi column (4.6  $\mu\text{m}$  particle size, 150 mm, 2.0 mm). The LC system was coupled to a mass spectrometry system consisting of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada). Chromatographic separations were performed at 30°C using mobile phase composed of (A) 95% methanol in water and (B) 0.1% formic acid in water with gradient elution as follows: 0–5min, 10% A; 5–7 min, 90% A; 7–10 min, 90% A; 10–17 min, 10% A and with a flow rate equal 250  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The software Analyst version 1.5.1 was used for the LC–ESI–MS/MS system control and data analysis. The experiments were performed using the Turbo Ion Spray™ source (electrospray ionization—ESI) in negative ion mode. The capillary needle was

maintained at  $-4500$  V. The MS/MS parameters were: curtain gas, 10 psi; temperature,  $400$  °C; gas 1.45 psi; gas 2.45 psi; and CAD gas, medium.

## 2.10 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis of the results was performed using the software Statistica® 7.0 (2008). One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out and the mean values were compared with Tukey's test considering a 5 % level of significance ( $p < 0.05$ ). All analyses were carried out in duplicate or triplicate and the results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 FITTING THE MODELS

Table 2.2 shows the total phenolic content (TFC) of pecan nut shell extracts found after extraction with ultrasound energy under different experimental conditions, using factorial design. The highest total phenolic contents ( $291.05$  mg GAE.g<sup>-1</sup>) for the aqueous phase extract was observed from experiment 1 (temperature  $60$  °C and solid-to-solvent ratio  $30$  mL.g<sup>-1</sup>). On the other hand, for the hydroalcoholic phase extract the highest total phenolic content ( $394.39$  mg GAE.g<sup>-1</sup>) was obtained from experiment 2 (temperature  $80$  °C, solid-to-solvent ratio  $30$  mL.g<sup>-1</sup> and ethanol concentration 20 % v/v).

PRADO et al. (2009a) MÜLLER et al. (2013) and PRADO et al. (2014), reported lower phenolic content (34 % to 57 %) for extracts of pecan nut shell obtained by infusion, indicating that ultrasound-assisted extraction may be an alternative to conventional extraction techniques in order to increase the extraction of these.

Analysis of variance (ANOVA) in Table 2.3 shows that the quadratic polynomial model was statistically significant with  $p$ -value of 0.003 and  $< 0.001$  and  $F$ -values of 0.23 and 46.5, for the aqueous and hydroalcoholic phases, respectively. The results showed in Table 2.3, also indicate that the fitting models were adequate to describe the experimental data, since its values for the lack of fit (1.55 and 6.8 for

aqueous and hydroalcoholic phases respectively) were not significant regarding to the pure error.

**Table 2.2:** Experimental and predicted values for total phenolic content of pecan nut shell extracts under different conditions of ultrasonic-assisted extraction based on a factorial design.

Treatment	Aqueous Extract				Hydroalcoholic Extract				
	Factorial design with coded values		Determination		Factorial design with coded values		Determination		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Experimental	Predicted	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Total phenolic content (mg GAE.g <sup>-1</sup> )	
	Temperature (°C)	Solid-to-solvent ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Experimental	Predicted	Temperature (°C)	Solid-to-solvent ratio (mL.g <sup>-1</sup> )	Ethanol concentration (% v/v)	Experimental	Predicted
1	-1	-1	291.05±8.88	244.02	-1	-1	-1	323.60±12.05	322.26
2	1	-1	237.12±3.57	228.33	1	-1	-1	394.39±22.55	388.72
3	-1	1	212.02±23.57	243.42	-1	1	-1	302.15±9.62	303.78
4	1	1	210.99±12.38	220.08	1	1	-1	345.66±21.79	340.81
5	-1	-1	281.66±2.18	244.02	-1	-1	1	338.63±11.55	340.39
6	1	-1	237.66±5.42	228.33	1	-1	1	352.69±19.54	356.99
7	-1	1	196.99±11.60	243.42	-1	1	1	287.12±1.47	284.72
8	1	1	219.53±4.61	220.08	1	1	1	265.90±0.76	269.42
9	0	0	274.81±9.44	260.43	0	0	0	352.69±1.54	341.39
10	0	0	229.17±12.07	260.43	0	0	0	329.42±1.54	341.39
11	0	0	280.14±22.92	260.43	0	0	0	338.15±2.84	341.39
12	0	0	242.27±2.72	260.43	0	0	0	360.51±2.83	341.39
13					0	0	0	338.15±11.31	341.39

14	0	0	0	0	329.42±13.11	341.39
15	-1	-1	-1	-1	320.93±6.41	322.26
16	1	1	-1	-1	383.05±15.68	388.72
17	-1	-1	1	-1	305.42±11.10	303.78
18	1	1	1	-1	335.96±42.56	340.81
19	-1	-1	-1	1	342.15±13.89	340.39
20	1	1	-1	1	361.30±9.73	356.99
21	-1	-1	1	1	282.33±42.43	284.72
22	1	1	1	1	272.93±44.05	269.42

mg GAE.g<sup>-1</sup> = equivalents in gallic acid per gram of extract;

**Table 2.3:** Optimization of extraction parameter for fitted factorial model by analysis of variance (ANOVA)

Source	Aqueous Extract - Total phenolic content ( $R^2=0.75$ )				Hydroalcoholic Extract – Total phenolic content ( $R^2=0.91$ )			
	SS	DF	MS	F-value <i>p</i> -Value	SS	DF	MS	F-value <i>p</i> -Value
Model	830.01	3	276.7	0.23 0.451	21465.9	6	3577.7	46.5 < 0.001
Lack of fit	1868.8	1	1868.8	1.55 0.252	1050.2	2	525.1	6.8 0.09
Pure error	8402.3	7	1200.3		1000.5	13	76.9	

SS, sum of squares; DF, degree of freedom; MS, mean square

### 3.2 FACTORIAL RESPONSE SURFACE ANALYSIS OF TOTAL PHENOLIC CONTENTS

The relationship between the extraction parameters and total phenolic content according to response surface analysis was quadratic with regression coefficient values ( $R^2$ ) of 0.75 and 0.91 for the aqueous and hydroalcoholic extract, respectively. The regression equations for aqueous (3) and hydroalcoholic (4) extract were generated as follow:

$$y \text{ (mg GAE/g)} = 266.45 - 0.21x_1 - 1.11x_2 - 0.02x_1x_2 \quad (3)$$

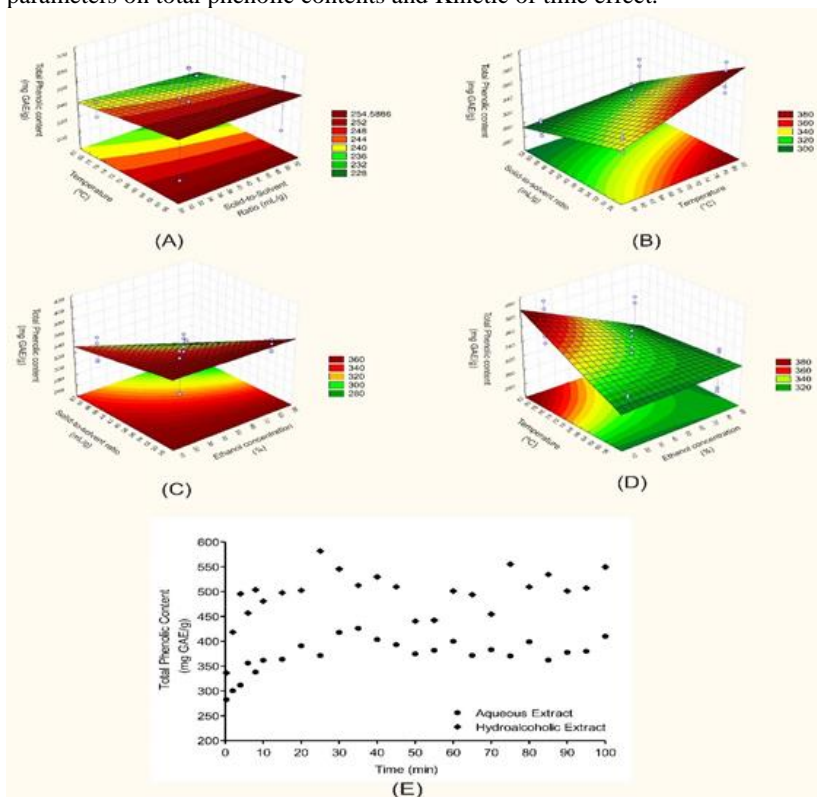
$$y \text{ (mg GAE/g)} = 330.12 + 13.09x_1 - 26.20x_2 - 13.0x_3 - 7.66x_1x_2 - 12.77x_1x_3 - 9.61x_2x_3 \quad (4)$$

The analysis showed that for the aqueous phase extract the temperature ( $x_1$ ), the solid-to-solvent ratio ( $x_2$ ), and the relationship between temperature and solid-to-solvent ratio ( $x_1x_2$ ) had lower significance ( $p$ -value > 0.05). In contrast, all parameters were significant for the hydroalcoholic phase extract ( $p$ -value < 0.05).

Figure 2.1 shows the relationship between the total phenolic contents and the extraction parameters. The highest TFC for the aqueous phase extract (Fig. 2.1A) was achieved at the lower temperatures and solid-to-solvent ratios. For the hydroalcoholic phase extract, the TFC increased at decreasing solid-to-solvent ratios and increasing extraction temperatures (Fig. 2.1B), at decreasing solid-to-solvent ratios and decreasing ethanol concentrations (Fig. 2.1C) and at increasing temperatures and decreasing ethanol concentrations (Fig. 2.1D).

Considering that solvents carry out the extraction process of the compounds of interest until the saturation or equilibrium state with the sample is reached, the solid-to-solvent ratio is the most significant variable that may directly affect the extraction efficiency (BOCHI et al., 2014). The results obtained for the solid-to-solvent ratio indicated that the lower volume used was sufficient to extract the phenolic compounds until the system reached equilibrium.

**Figure 2.1:** Response surface plots for the effect of different extraction parameters on total phenolic contents and Kinetic of time effect.



Notes: (A) The total phenolic contents vs. extraction temperature and solid-to-solvent ratio for aqueous extract; (B) the total phenolic contents vs. extraction temperature and solid-to-solvent ratio for hydroalcoholic extract; (C) the total phenolic contents vs. ethanol concentration and solid-to-solvent ratio for hydroalcoholic extract; (D) the total phenolic contents vs. ethanol concentration and extraction temperature for hydroalcoholic extract; (E) kinetic curve of time extraction.

The different responses of extraction temperature obtained for the aqueous and hydroalcoholic phases are probably associated with the nature and polarity of the phenolic compounds extracted. The diffusion



phenomena related to the solvent extraction process of phenolic compounds are in general favored by higher temperatures (MOHAMAD et al., 2010) however, in the presence of ultrasound waves the yield of extraction of phenolic compounds is further augmented by the vibratory effects on the molecules of the sample cell wall, which facilitates migration of free phytochemicals to the solvent. However, the over elevated temperatures that can be reached under sonication conditions can degrade the phenolic compounds (CHEN, et al., 2015). In addition, an increase of the polarity of the solvent by mixing of water with the ethanol solvent can favour the extraction of phenolic compounds (SPIGNO et al., 2007; MARTINS et al., 2012).

### 3.3 OPTIMIZED PARAMETERS AND MODEL VALIDATION

The higher phenolic content (291.05 mg GAE.g<sup>-1</sup>) for the extraction with water was obtained at 60 °C and with a solvent-to-solid ratio of 30 mL.g<sup>-1</sup>. On the other hand, the optimum conditions for the extraction with the hydroalcoholic solution (394.39 mg GAE.g<sup>-1</sup> of phenolic compounds in the extract) were obtained at a temperature of 80 °C, a solvent-to-solid ratio of 30 mL.g<sup>-1</sup> and an ethanol concentration of 20 %, v/v. No significant differences were found between the experimental and model results.

The optimal parameters found were close to those reported in the literature. ŞAHİN et al. (2013) described similar results for the optimum temperature for the extraction of antioxidants from *Artemisia absinthium* (64-70 °C). A similar solid-to-solvent ratio (30.7 mL.g<sup>-1</sup>) has been reported for the extraction of chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv (LIU et al., 2013).

### 3.4 KINETIC OF EXTRACTION

Figure 2.1E shows the effect of time (0 – 100 min) on the extraction of phenolic compounds for each extracted phase, using the optimum parameters (temperature, solid-to-solvent ratio and ethanol concentration) determined with the response surface analysis. The extraction of phenolic compounds increased with time until an optimum time was reached (35 and 25 minutes for the aqueous and

hydroalcoholic phases, respectively). After this period, the extraction process decreases, possibly due to the structural destruction and the decomposition of phenolic compounds during the prolonged extraction time. This may be attributed to radical species (e.g., hydroxyl and peroxy radicals) produced under sonication in the presence of water, which attack the phenolic species degrading the molecules (JOSEPH et al., 2009, 2011). Using these times in addition to the other important factors will increase the extraction of phenolic compounds from pecan nut shell.

### 3.5 EXTRACTS CHARACTERIZATION

Table 2.4 shows the results obtained for the total phenolics, condensed tannins and antioxidant activity (ABTS and DPPH) for aqueous and hydroalcoholic pecan nut shell extracts using the optimal conditions obtained (RSM and kinetic of extraction) for ultrasonic-assisted extraction.

There was no significant difference between the aqueous and hydroalcoholic extract for the content of total phenolic, condensed tannins and antioxidant activity. Other authors reported a total phenolic compounds concentration between 94-192 mg GAE.g<sup>-1</sup> and 164 to 167 mg GAE.g<sup>-1</sup> using infusion with water and ethanol respectively (PRADO et al., 2009b, 2009c, 2013, 2014; RECKZIEGEL et al., 2011; BENVENU et al., 2013; MÜLLER et al., 2013; PORTO et al., 2013). In this study, higher values for condensed tannins were found indicating that the extraction by ultrasound-assisted using optimized conditions of temperature, solid-to-solvent ratio, solvent concentration and time, allowed the extraction of higher concentrations of total phenolic compounds and condensed tannins. Based on the results obtained, the ultrasound energy can be considered as an important tool to increase phenolic compounds extraction from complex matrices, although the quality and composition of the extracts should be further considered due to the possible degradation of species from the radical species produced under sonication.

Table 2.4 shows that the antioxidant activity in the ABTS system was between 16 % and 57 % higher when compared with other studies in the ABTS system in aqueous and hydroalcoholic extracts

respectively. On the other hand, for the DPPH system, the increase was 107 % for both extracts. These results are in agreement with the higher concentrations of phenolic compounds found for the optimized conditions studied using the ultrasound assisted extraction which may lead to an increase in the antioxidant activity of these extracts. Besides the optimized conditions the heat generate by cavitation may have improved solubilization of substances, and the jets may have helped to disrupt the plant cells, allowing the entrance of the solvent into the matrix and increasing the extraction efficiency (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003). The cavitation also may rupture structures of condensed compounds exposing larger amount of hydroxyl groups from phenolic compounds and increasing the antioxidant activity of the extracts.

**Table 2.4:** Characterization of pecan nut shell extracts

	This study			Reported in the literature	
	Aqueous Extract (infusion + ultrasound)	Hydroalcoholic Extract (infusion + ultrasound)	Aqueous Extract (infusion)	Hydroalcoholic Extract (infusion)	Hydroalcoholic Extract (infusion)
<b>Determination</b>					
TFC (mg GAE.g <sup>-1</sup> )	426.15 <sup>a</sup> ± 35.69	581.90 <sup>a</sup> ± 42.08	192.4 ± 0.6 (BENVEGNUM et al., 2013) 128.27 ± 0.84 (PORTO et al., 2013) 167 ± 9.8 (PRADO et al., 2009b) 94.04 ± 2.66 (PRADO et al., 2013) 181.49 ± 6.97 (PRADO et al., 2014)	164.2 ± 0.2 (PRADO et al., 2009c) 167.85 ± 3.89 (PRADO et al., 2014)	
CT (mg CE.g <sup>-1</sup> )	76.82 <sup>a</sup> ± 2.97	71.08 <sup>a</sup> ± 2.15	58.43 ± 2.25 (BENVEGNUM et al., 2013) 58.43 ± 2.25 (MÜLLER et al., 2013) 46.78 ± 0.36 (PORTO et al., 2013) 43.19 ± 0.44 (PRADO et al., 2013)	1.0 ± 1.65 (PRADO et al., 2009b)	
AA <sub>ABTS</sub> (µmol TEAC.g <sup>-1</sup> )	2574.32 <sup>a</sup> ± 9.90	2573.00 <sup>a</sup> ± 2.27	2218.8 ± 2.5 (BENVEGNUM et al., 2013) 368.3 ± 0.6 (PRADO et al., 2009b) 1333.10 ± 14.82 (PRADO et al., 2013) 1809.01 ± 27.18 (PRADO et al., 2014) 2218.8 ± 70.8 (RECKZIEGEL et al., 2011)	1562.51 ± 33.15 (PRADO et al., 2014)	
A <sub>DPPH</sub> (µg TEAC.g <sup>-1</sup> )	1268.03 <sup>a</sup> ± 0.18	1287.08 <sup>a</sup> ± 0.24	529.4 ± 7.6 (BENVEGNUM et al., 2013) 346.57 ± 5.64 (PRADO et al., 2013) 612.24 ± 26.73 (PRADO et al., 2014)	620.6 ± 0.1 (PRADO et al., 2009b) 524.77B ± 40.72 (PRADO et al., 2014)	

---

TFC = total phenolic content– mg GAE.g<sup>-1</sup> (equivalents in gallic acid) (Folin–Ciocalteu assay); CT = condensed tannins – mg CE.g<sup>-1</sup> (catechin equivalents) (Vanillin test); AA = antioxidant activity – μmol TEAC.g<sup>-1</sup> (equivalent antioxidant activity in Trolox) (ABTS and DPPH assay). The same letters in the same row do not differ significantly (T test, p < 0.05) for the extracts.

### 3.6 IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY LC-ESI-MS/MS

Table 2.5 shows the parameters of identification, quantification and results of concentration of each phenolic compound obtained for the aqueous and hydroalcoholic extracts. Between the 49 phenolic compounds tested, 29 were identified in the aqueous extract and 27 in the hydroalcoholic extract. For aqueous extract the major phenolic compound was the catechin ( $260.09 \pm 47.04 \text{ mg.g}^{-1}$ ) followed by gallic acid ( $128.12 \pm 32.25 \text{ mg.g}^{-1}$ ). The hydroalcoholic extract showed similar composition, with  $351.56 \pm 43.19 \text{ mg.g}^{-1}$  of catechin and  $138.46 \pm 40.13 \text{ mg.g}^{-1}$  of gallic acid. However, in the hydroalcoholic extract, the compounds 4-methylumbelliferone and mandelic acid were not identified. Significant differences between the aqueous and hydroalcoholic extracts of pecan nut shell for two phenolic compounds (catechin and myristylrine) were observed.

The pecan nut shell extracts obtained with ultrasound extraction investigated in this study shows a great number more phenolic compounds. Previous studies by other authors (ROSA et al., 2011; BENVIGNU et al., 2013; PORTO et al., 2013) reported only gallic acid and ellagic acid in pecan nut shells extract. Our work group had already identified gallic acid, chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, epigallocatechin and epicatechin-gallate in infusion of pecan nut shell (PRADO et al., 2014). In this study, 24 phenolic compounds that have not been reported yet in the literature for this raw material were identified.

The concentration of gallic acid ( $128.12 \pm 32.25 \text{ mg.g}^{-1}$ ) and epicatechin gallate ( $0.29 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1}$ ) in aqueous extract were higher than those reported by PRADO et al. (2014). It may be attributed to sample preparation, method of extraction and also to sample preparation prior to LC analysis. The ultrasound energy helped to leach the pecan shells, favoring the extraction of the identified compounds. In addition, the preparation of sample, injection and chromatographic analysis immediately after extraction may have favored the identification of phenolic compounds that had not yet been reported since they are sensitive to degradation.

Phenolic compounds, including single phenolic acids, flavonoids, stilbenes and a variety of other polyphenolic compounds, have one or more hydroxyl groups conjugated to an aromatic hydrocarbon group, which characterizes the phenolic structure (HAMINIUK et al., 2011). The phenolic structure gives these compounds antioxidant activity, which may be higher or lower depending on the position and number of hydroxyls (SCHROETER et al., 2002). RIBEIRO et al. (2017) reported that pecan nut shell aqueous extract may be considered as a natural product replacement for the synthetic antioxidant BHT in margarines. The presence of a large number of phenolic compounds in pecan nut shell extracts may explain the antioxidant activity demonstrated for the pecan nut extracts.

**Table 2.5:** Phenolic profile (mg.g<sup>-1</sup> of dry sample) of pecan nut shell extracts.

	Phenolic compounds	[M-H] (m/z)	Quantitative ion (m/z)	LOD (mg.L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg.L <sup>-1</sup> )	Retention time	Content in Aqueous Extract	Content in Hydroalcoholic Extract
1	Salicylic acid <sup>#</sup>	136.90	91.10	0.0052	0.017	10.99	0.051±0.013 <sup>a</sup>	0.083±0.011 <sup>a</sup>
2	P-anisic <sup>#</sup>	150.80	105.20	0.110	0.381	11.34	<LOQ	<LOQ
3	Mandelic acid <sup>#</sup>	150.80	106.80	0.130	0.417	7.86	0.615±0.034 <sup>a</sup>	<LOD
4	Vanillin <sup>#</sup>	150.80	132.80	0.014	0.048	10.42	0.142±0.047 <sup>a</sup>	0.098±0.008 <sup>a</sup>
5	Protocatechuic acid <sup>#</sup>	153.00	109.00	0.0064	0.021	6.95	2.267±0.401 <sup>a</sup>	3.292±0.080 <sup>a</sup>
6	P-coumaric <sup>#</sup>	163.04	119.00	0.0014	0.005	10.46	0.081±0.003 <sup>a</sup>	0.138±0.009 <sup>a</sup>
7	Vanillic acid <sup>#</sup>	166.80	148.50	0.011	0.036	9.65	6.923±0.093 <sup>a</sup>	9.010±0.167 <sup>a</sup>
8	Galic acid	168.83	124.10	0.023	0.076	3.98	128.12±32.25 <sup>a</sup>	138.46±40.13 <sup>a</sup>
9	4-methylumbelliferone <sup>#</sup>	174.85	130.50	1.00	3.452	11.52	<LOQ	<LOD
10	Ferulic acid <sup>#</sup>	192.85	129.70	0.0051	0.017	10.73	0.160±0.112 <sup>a</sup>	0.308±0.052 <sup>a</sup>
11	Silyngic <sup>#</sup>	196.80	119.60	0.0095	0.032	10.01	0.590±0.038 <sup>a</sup>	0.902±0.043 <sup>a</sup>
12	Sinapaldehyde <sup>#</sup>	206.90	174.40	0.002	0.009	11.39	<LOQ	<LOQ
13	Resveratrol <sup>#</sup>	226.90	181.60	0.0098	0.021	11.14	<LOQ	<LOQ
14	Apigenin <sup>#</sup>	268.79	114.80	0.00059	0.002	12.62	<LOQ	<LOQ
15	Galangin <sup>#</sup>	268.81	59.90	0.0082	0.027	13.44	<LOQ	<LOQ
16	Naringenin <sup>#</sup>	270.85	150.20	0.00089	0.003	12.37	0.046±0.013 <sup>a</sup>	0.078±0.027 <sup>a</sup>
17	Eriodictyol <sup>#</sup>	286.82	132.10	0.010	0.034	11.85	0.117±0.013 <sup>a</sup>	0.117±0.063 <sup>a</sup>
18	Aromadendrin <sup>#</sup>	286.80	123.90	0.002	0.007	11.29	<LOQ	<LOQ
19	Fustin <sup>#</sup>	286.83	105.60	0.0024	0.008	10.32	0.024±0.005 <sup>a</sup>	0.096±0.033 <sup>a</sup>
20	(+) - Catechin <sup>#</sup>	288.85	120.30	0.0086	0.029	8.82	260.09±47.036 <sup>a</sup>	351.559±43.19 <sup>b</sup>
21	(-) - Epicatechin <sup>#</sup>	288.95	122.30	0.032	0.107	9.41	24.976±3.317 <sup>a</sup>	24.394±2.494 <sup>a</sup>



22	Ellagic acid	300.81	142.50	0.013	0.044	11.71	11.591±1.078 <sup>a</sup>	36.310±0.299 <sup>a</sup>
23	Quercetin <sup>#</sup>	301.00	149.30	0.0065	0.022	10.84	0.262±0.100 <sup>a</sup>	0.284±0.031 <sup>a</sup>
24	Taxifolin <sup>#</sup>	302.80	120.70	0.0057	0.019	10.70	3.993±0.482 <sup>a</sup>	5.593±0.405 <sup>a</sup>
25	Myricetin <sup>#</sup>	316.87	150.60	0.200	0.680	11.24	12.323±1.431 <sup>a</sup>	58.287±13.589 <sup>b</sup>
26	Chlorogenic acid	352.86	187.80	0.0021	0.007	9.19	0.145±0.004 <sup>a</sup>	0.145±0.013 <sup>a</sup>
27	Rosmarinic acid <sup>#</sup>	358.99	159.80	0.00028	0.001	10.83	0.006±0.001 <sup>a</sup>	0.005±0.001 <sup>a</sup>
28	Epicatechin gallate	441.60	168.90	0.038	0.126	10.13	0.286±0.014 <sup>a</sup>	0.731±0.095 <sup>a</sup>
29	Epigallocatechin	304.82	124.90	0.062	0.205	8.15	2.477±0.713 <sup>a</sup>	4.732±0.436 <sup>a</sup>

LOD = limit of identification; LOQ = limit of quantification. The same letters in the same row do not differ significantly (Tukey test,  $p < 0.05$ ) for the extracts. <sup>#</sup> = phenolic compounds identified for the first time.

#### 4. CONCLUSIONS

Aqueous and hydroalcoholic extracts of pecan nut shell showed a high content and also a large variety of phenolic compounds after ultrasound-assisted extraction. The factorial design and kinetic methodologies were successfully employed to optimize important parameters of extraction. The results showed that extraction temperature, solid-to-solvent ratio, ethanol concentration and extraction time are significant and the quadratic model obtained is satisfactory and accurate to predict the extraction yield. Ultrasound energy can be considered as an important tool to increase phenolic compounds and antioxidant activity from complex matrices such as pecan nut shell. The sample preparation, extraction and analysis conditions used in this study allowed the identification of 29 and 27 compounds and the quantification of 22 and 21 compounds for the aqueous and hydroalcoholic extracts, respectively. Among these compounds 24 of them have not been previously reported in the literature for this kind of extracts. The results obtained in the present study showed that the sample preparation, extraction and analysis procedures are very important for obtaining reliable results. Further studies should focus on the analysis of the composition and quality of the extracts and a comparison of these with those obtained from more traditional extraction processes.

#### REFERENCES

- ABDALLAH, H. M.; SALAMA, M. M.; ABD-ELRAHMAN, E. H.; EL-MARAGHY, S. A. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin- induced diabetic rats. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 337–341, 2011.
- BASGEDIK, B.; UGUR, A.; SARAC, N. Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 526–530, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.022>>. .
- BENVEGNÚ, D.; BARCELOS, N.; BOUFLEUR, N.; et al. Protective Effects of a By-Product of the Pecan Nut Industry ( *Carya illinoensis* )

on the Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats *Carya illinoensis* Protects Against Cyclophosphamide- Induced Toxicity. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 29, n. 3, p. 185–197, 2010.

BENVEGNO, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; ROVERSI, K.; et al. Aqueous extract of pecan nut shell (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) exerts protection against oxidative damage induced by cyclophosphamide in rat testis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 32, n. 4, p. 329–341, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579785>>. .

BOCHI, V. C.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; et al. Polyphenol extraction optimisation from *Ceylon gooseberry* (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, v. 164, n. 2014, p. 347–354, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.031>>. .

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian Blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1236–1238, 1980. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60232a056>>. .

CHEMAT, F.; TOMAO, V.; VIROT, M. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. In: S. Otlés (Ed.); **Handbook of Food Analysis Instruments**. p.85–94, 2008. New York: CRC Press.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.110>>. .

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011.

HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 1, p. 1–7, 2005.

HILBIG, J., POLICARPI, P.B., GRINEVICIUS, V.M.A.S., MOTA, N.S.R.S., TOALDO, I.M., LUIZ, M.T.B., PEDROSA, R.C., BLOCK, J.M. Aqueous extract from Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. **Journal of Ethnopharmacology**, JEP\_2017\_1509 (in press).

JOSEPH, C. G.; LI PUMA, G.; BONO, A.; KRISHNAIAH, D. Sonophotocatalysis in advanced oxidation process: A short review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 5, p. 583–589, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.002>>. .

JOSEPH, C. G.; PUMA, G. L.; BONO, A.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; KRISHNAIAH, D. Operating parameters and synergistic effects of combining ultrasound and ultraviolet irradiation in the degradation of 2,4,6-trichlorophenol. **Desalination**, v. 276, n. 1–3, p. 303–309, 2011.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E.; SIEBENHANDL, S.; BAUER, F. The antioxidative properties of *Holy basil* and *Galangal* in cooked ground pork. **Meat Science**, v. 72, n. 3, p. 446–456, 2006.

KALIORA, A. C.; KOGIANNOU, D. A. A.; KEFALAS, P.; PAPASSIDERI, I. S.; KALOGEROPOULOS, N. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of *Greek herbal* infusions; Balancing delight and chemoprevention? **Food Chemistry**, v. 142, p. 233–241, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.056>>. .

LAMPE, J. W. Spicing up a vegetarian diet : chemopreventive effects of phytochemicals. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 579–583, 2003.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (E. ulmodies). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295–300, 2005.

LIU, Y.; WEI, S.; LIAO, M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 837–843, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.023>>. .

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: A powerful tool for leaching. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.

MARTINS, S.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 88, p. 163–167, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.020>>. .

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MOHAMAD, M.; ALI, M. W.; AHMAD, A. Modelling for extraction of major phytochemical components from *Eurycoma longifolia*. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 21, p. 2572–2577, 2010.

MÜLLER, L. G.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; et al. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1–2, p. 165–171, 2013. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.08.002>>. .

PORTO, L. C. S.; SILVA, J. DA; FERRAZ, A. D. B. F.; et al. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 579–85, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831307>>. Acesso em: 7/1/2015.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M.

Phenolic compounds and antioxidant activity of pecan [ *Carya illinoensis* ( Wangerh .) C . Koch ] shell extracts. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 323–332, 2009b.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangerh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 5, p. 458–467, 2009c. Disponível em: <<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/582/596>>. Acesso em: 7/1/2015.

PRADO, A. C. P.; MANION, B. A.; SEETHARAMAN, K.; et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [ *Carya illinoensis* ( Wangerh ) C . Koch ]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64–73, 2013.

PRADO, A. C. P.; SILVA, H. S.; SILVEIRA, S. M.; et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangerh) C. Koch] shell. **Industrial Crops & Products**, v. 52, p. 552–561, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.031>>. .

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. VAN; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214–1218, 1978. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60219a031>>. .

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice : Beneficial effects of pecan nut shells extract , a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

- RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95–100, 2008.
- ROSA, L. A. D. LA; ALVAREZ-PARRILLA, E.; SHAHIDI, F. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Kernels and Shells of Mexican Pecan (*Carya illinoensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 152–162, 2011.
- ŞAHİN, S.; AYBASTIER, Ö.; İŞİK, E. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1361–1368, 2013.
- SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; et al. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 861–880, 2002.
- SCHULZ, M.; BORGES, G. DA S. C.; GONZAGA, L. V.; et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>>. .
- SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M. DE. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 2007.
- TREVIZOL, F.; BENVENÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 13–18, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.026>>. .
- VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars.

**Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241–1249, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606005796>>. Acesso em: 18/12/2014.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**, (pp. 39 – 45). New York, USA: Chapman & Hall, 1994.



**CAPITULO 3: EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE NOZ PECÃ  
[*Carya illinoensis* (WANGENH) C. KOCH] APRESENTA  
ATIVIDADE CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA  
MCF-7 E TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM  
CAMUNDONGOS BALB-C**

Artigo aceito para publicação (Anexo C):

Aqueous extract from Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. **Journal of Ethnopharmacology**. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.012>)

**RESUMO**

*Relevância etnofarmacológica:* no Brasil, muitos transtornos de saúde são tratados com o consumo de diferentes variedades de chá. Os extratos de casca de noz de pecã (*Carya illinoensis*), que possuem quantidades significativas de compostos fenólicos em sua composição, são popularmente tomados como chá para prevenir diversas patologias. Os compostos fenólicos do extrato de casca de pecã foram associados a diversos efeitos biológicos, mas o efeito nas células tumorais ainda não foi relatado.

*Objetivo do estudo:* o objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre a fragmentação do DNA, a parada do ciclo celular e a apoptose induzida pelo extrato da casca de noz pecã e sua atividade antitumoral.

*Materiais e métodos:* a citotoxicidade, a proliferação, a morte celular e o ciclo celular foram avaliados em células MCF-7 pelos ensaio de MTT, proliferação de colônias, análise de coloração diferencial com iodeto de propídio/laranja de acridina e citometria de fluxo, respectivamente. Os efeitos de dano ao DNA foram avaliados através da intercalação com CT-DNA e clivagem do DNA plasmidial. A inibição do crescimento tumoral, o aumento do tempo de sobrevivência, a apoptose e a parada do ciclo celular foram avaliadas em tumor de ascítico de Ehrlich em camundongos Balb / C.

*Resultados:* o efeito citotóxico dos extratos de casca de noz pecã envolveu a indução de morte celular por apoptose e também a parada do ciclo celular em células MCF-7. O tempo de sobrevivência em

camundongos com tumor ascítico de Ehrlich aumentou 67%. O dano ao DNA foi observado nos ensaios CT-DNA, DNA plasmidial e cometa. O mecanismo envolvido no efeito antitumoral dos extratos da casca de noz pecã pode estar relacionado à ativação de proteínas-chave envolvidas na morte celular por apoptose (Bcl-XL, Bax e p53) e na regulação do ciclo celular (ciclina A, ciclina B e CDK2).

*Conclusões:* os resultados obtidos foram atribuídos ao perfil fenólico do extrato, que apresentou compostos como os ácidos gálico, 4-hidroxibenzoico, clorogênico, vanílico, cafeico e elágico além de catequina, epicatequina, epigallocatequina e epicatequina galato. Foi observado que os extratos de casca de noz pecã são eficazes contra o crescimento das células tumorais e podem ser considerados como uma alternativa ao tratamento do câncer.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos, casca de noz pecã, efeitos antitumorais, células de câncer de mama MCF-7, tumor ascítico de Ehrlich, apoptose.

## 1. INTRODUÇÃO

*Carya illinoensis* [(Wangenh.) C. Koch] da família Juglandaceae é comumente conhecida como noz pecã. Foi originalmente cultivada na América do Norte e atualmente seu cultivo pode ser encontrado em outros países americanos (México, Argentina, Chile e Brasil) além de outros lugares, como Austrália, África do Sul e Israel (BRAZIL, 1990; CALL et al., 2006). O processamento industrial da noz pecã resulta em uma grande quantidade de cascas, um subproduto que representa aproximadamente 40-50% da massa original total, que são vendidas em pedaços para o preparo de chá (PRADO et al., 2013). O uso etnofarmacológico do chá da casca de noz pecã inclui a prevenção e tratamento de várias doenças como diabetes, obesidade, hipertensão, hipercolesterolemia, câncer e doenças de caráter inflamatório (WORLEY, 1994). Assim, diante da crescente incidência de doenças crônicas e degenerativas em todo o mundo, estimula-se a busca de novas fontes de compostos ativos e os tratamentos alternativos são fortemente encorajados.

Os efeitos terapêuticos do chá da casca de noz pecã foram associados à presença de diversos compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonóides, proantocianidinas e taninos condensados. VILLARREAL-LOZOYA et al. (2007); MALIK et al. (2009) e PRADO et al. (2013, 2014) demonstraram a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato da casca de noz pecã.

A proteção do extrato da casca de noz de pecã contra o dano oxidativo induzido pela ciclofosfamida em diferentes órgãos em modelos animais foi mostrada por BENVENU et al. (2010, 2013). Os extratos de casca de noz pecã também demonstraram minimizar o dano no fígado de ratos causados por estresse oxidativo após a ingestão crônica de etanol (MÜLLER et al., 2013). Além disso diminuíram a ansiedade causada pela abstinência do cigarro, atuando como um ansiolítico natural (RECKZIEGEL et al., 2011). Os compostos fenólicos isolados da casca de noz pecã mostraram atividades hipoglicêmicas e antioxidantes significativas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ABDALLAH et al., 2011). Em um estudo mais recente do nosso grupo (*dados ainda não publicados*), as atividades de hipolipidemia, hipoglicemia e antiobesidade foram observadas em camundongos Balb-C isogênicos que receberam dietas com altas proporções de calorias e foram suplementados com extratos de casca de noz pecã.

A atividade anticarcinogênica de compostos fenólicos de diferentes fontes já foi amplamente estudada e a capacidade destes compostos para inibir vários mecanismos do desenvolvimento do tumor em experiências *in vivo* também foi relatada (BAEK et al., 2004; LIM et al., 2006; VERMA et al., 2013; SEIDEL et al., 2014). A ativação da caspase-3 e da caspase-9, que são proteínas envolvidas nas vias de sinalização para a apoptose, a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) (LI et al., 2016) a parada do ciclo celular (ROLEIRA et al., 2015), a modulação de genes que codificam para metástases e angiogênese (VERMA et al., 2013) e a fragmentação do DNA (SILVA et al., 2014) são alguns dos mecanismos propostos para os efeitos antitumorais de compostos fenólicos.

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas por distúrbios proliferativos e crescimento celular descontrolado (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esta condição é geralmente diagnosticada com

falhas em sinais moleculares para indução da apoptose em células cancerígenas. Portanto, a proliferação celular descontrolada e o atraso da morte celular por apoptose geralmente resultam no crescimento tumoral (SILVA et al., 2014).

A associação entre a alta ingestão de compostos fenólicos de fontes vegetais e a proteção contra diferentes tipos de câncer já foi estabelecida, mas os efeitos dos extratos da casca de noz pecã no desenvolvimento de tumores são menos comuns na literatura. Neste estudo, investigou-se o efeito antitumoral do extrato da casca de noz pecã em células de câncer de mama (MCF-7) e em células de tumor ascítico de Ehrlich de camundongos Balb-C para determinar o impacto do tratamento no desenvolvimento de tumores.

## 2. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES E ANTICORPOS

O meio de cultivo Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), o soro fetal bovino (fetal bovine serum-FBS) e os antibióticos foram adquiridos da empresa Cultilab (Campinas, S. Paulo, Brasil) que fornece estes materiais produzidos pela Gibco (EUA). A albumina sérica bovina (bovine serum albumin - BSA), o sal de tetrazólio (MTT), a diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o ácido ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), o DNA de timo de vitelo (calf thymus DNA – CT DNA), a agarose, o brometo de etídio, o iodeto de propídio, o ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric acid - TBA), o dimetil sulfóxido (DMSO) o coquetel inibidor de proteases produzidos pela Sigma-Aldrich e que foram adquiridos da empresa Sigma-Brasil (São Paulo, SP; Brasil). O coquetel inibidor de fosfatases foi adquirido da empresa Calbiochem (Merck Biosciences). Os anticorpos policlonais anti-Rabbit contra p53 e anti-ciclina A, e os anticorpos policlonais anti-mouse contra Bcl-xL e anti-Bax foram adquiridos de empresa brasileira representante comercial da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EUA). O anticorpo monoclonal antimouse contra  $\beta$ -actin e o conjunto de detecção por quimioluminescência contendo anticorpos secundários acoplados à horseradish peroxidase (HRP) foram obtidos junto à representante brasileira da Millipore (EUA). Os demais reagentes inclusive os

solventes empregados nas análises fitoquímicas foram todos de grau analítico.

## 2.2 AMOSTRAS

As casca de noz pecã da variedade Barton (colhidas em 2013) foram fornecidas pela EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural).

## 2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As amostras secas, moídas e torradas (1,0 g) de casca de noz pecã (RODRIGUES et al., 2008; PRADO et al., 2014) foram extraídas em ultrassom (banho de limpeza ultra-sônica - Modelo EGS 5HD, 40 kHz, 300 W, Enge Solutions®, São Paulo, Brasil) por 35 minutos a 60 °C com 30 mL de água. Após a sonicação o extrato foi filtrado e seco em spray drier (BÜCHI, modelo B-290, São Paulo, Brasil). As condições de secagem foram: temperatura do ar de entrada e saída de 150 °C e 50 °C, respectivamente, com aspirador ajustado em 100 % e bomba a 25 %.

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

### 2.4.1 Preparação da amostra

A preparação da amostra foi realizada de acordo com PORTO et al. (2013) com algumas modificações. O extracto seco (150 mg) foi diluído em 12 mL de HCl 2 mol/L e mantido durante 2 horas a 80 °C no ultrassom funcionando numa frequência de 40 kHz e 250 W. A solução foi resfriada e o seu pH ajustado para 2 com NaOH. Foi utilizado éter etílico (18 mL por 3 vezes) para extrair os compostos fenólicos. As frações obtidas foram combinadas e o solvente foi evaporado. A alíquota obtida foi redissolvida em metanol (1 mL grau HPLC) e filtrada em um filtro de seringa de 0,45 µm antes das injeções.

## 2.4.2 Análise Cromatográfica

A análise de HPLC foi realizada de acordo com a metodologia proposta por BURIN et al. (2011) com modificações. Um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com modelo de bomba de alta pressão LC-20AT; degenerador DGU-20A5; forno modelo CTO-20A; injetor manual; sistema de controle CBM-20A; detector de matriz de diodo SPD-M20A e, software de soluções LC na versão 1.21 foi usado. Uma coluna Shim-pack C18 série CLC-ODS (M) (Shimadzu) (250 mm x 4,6 mm e diâmetro de partícula interno de 5  $\mu$ m) foi utilizada com uma coluna de proteção C18 série G-ODS (10 mm x 4 mm) (Shim -pacote). A fase móvel consistiu de água Milli-Q com pH ajustado para 2,6 com ácido acético como solvente A e 20 % da solução A com 80 % de acetonitrila como solvente B. O gradiente de eluição utilizado foi 0-30 % de B entre 0 a 25 min; 50 % de B a 30 min; 100 % de B de 35 a 40 min e, depois de 41 min, voltou à condição inicial com um acondicionamento de coluna de 6 min. Foi utilizada uma taxa de fluxo do eluente de 1 mL/min e o volume de injeção foi ajustado em 20  $\mu$ L. A detecção de cada substância foi empregada nos comprimentos de onda de absorvância adequados. A quantificação dos compostos individuais foi realizada usando calibração externa, com todas as análises realizadas em triplicata.

## 2.5 ENSAIOS *IN VITRO*

### 2.5.1 Cultura de células

A linhagem de células de carcinoma de mama humano (MCF-7) foi adquirida no banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas a 37 °C; atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade do ar, num meio de cultura DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina.

### 2.5.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade contra células MCF-7 foi determinada utilizando sal de tetrazolio (MTT). O ensaio foi realizado de acordo com

o método de MOSMANN (1983), onde  $10^4$  células/poço foram tratadas com extrato de casca de noz pecã (5 - 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas. O controle negativo foi tratado apenas com meio de cultura padrão durante 24 horas. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas durante 2 horas com MTT (0,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ). O produto da reação foi medido à 550 nm. Os resultados foram apresentados como a concentração do extrato da casca de noz pecã necessária para eliminar cinquenta por cento do número de células iniciais ( $\text{EC}_{50}$ ) após 24 horas, com três experimentos independentes. A fim de demonstrar a seletividade do extrato de casca de noz pecã, o ensaio MTT, utilizando as mesmas condições de análise, foi realizado em células normais de fibroblastos 3T3.

### **2.5.3 Ensaio de formação de colônias (antiproliferativo)**

O ensaio de formação de colônias foi utilizado para estimar os efeitos do extrato da casca de noz pecã na proliferação celular. A análise foi realizada de acordo com o método relatado em FRANKEN et al. (2006). As células MCF-7 (500/poço), aderidas em placas de seis poços, foram tratadas com um meio de cultura (controle negativo) e com meio de cultura contendo extrato da casca de noz de pecã (15, 20 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas durante 24 horas. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se meio fresco e as células foram incubadas durante 20-25 dias. Após este período, as células foram coradas com violeta de cristal para determinar o número de unidades formadoras de colônias.

### **2.5.4 Avaliação do tipo de morte celular**

As células MCF-7 ( $5 \times 10^6$  células/mL) foram colocadas em placas de 96 poços e incubadas em ambiente controlado. O meio de cultura (DMEM) foi removido e as células foram incubadas no meio contendo 44,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\text{EC}_{30}$ ) de extrato da casca de noz pecã por 24 horas. As células com meio fresco foram utilizadas como controle negativo. Após esse período, as células foram então centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi rejeitado e as células ressuspensas em 25  $\mu\text{L}$  de PBS e adicionadas de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução

de corante (brometo de etídio / acridina laranja 1: 1). As células coradas foram observadas sob um microscópio de fluorescência e para cada amostra, foram contadas 300 células. Os dados foram expressos como a porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas de três experiências independentes realizadas em dias diferentes.

### **2.5.5 Análise do ciclo celular**

As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 6 poços (50-100 x 10<sup>3</sup>) e sincronizadas com nocodazol (30 ng/mL) durante 14 horas. As células foram tratadas por até 24 horas com meio de cultura padrão (controle negativo) e com meio contendo extrato da casca de noz de pecã (EC<sub>30</sub> = 44,4 µg/mL). Após esse período procedeu-se uma lavagem e o sedimento celular foi ressuspensão em etanol a 70% gelado e armazenados a -20 °C durante a noite. Finalmente, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas durante 20 min numa solução de permeabilização à base de saponina (BSA 2%, ribonuclease A 0,2 mg/mL e iodeto de propídio 50 µg/mL). A citometria de fluxo foi realizada usando LSRFortessa (BD Biosciences). Os dados da FACS foram analisados usando o Flowing Software versão 2.5.1 (Turku, Finlândia).

### **2.5.6 Efeitos no DNA**

A intercalação do DNA foi examinada por medições de fluorescência como no método proposto por SILVEIRA, DA et al. (2011). O CT-DNA (40 µmol/L) foi saturado com iodeto de etídio (50 µmol/L) em 50 mmol/L de fosfato tampão contendo NaCl 0,1 M (pH 7,4). A fluorescência foi medida com extrato da casca de noz de pecã (0-80 µg/mL) e concentrações constantes de CT-DNA e iodeto de etídio. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram 492 nm e 620 nm, respectivamente.

A fragmentação do DNA foi realizada como em SREEDHARA; COWAN, (2001). A análise utilizou DNA plasmidial (600 ng) incubado com extrato da casca de noz pecã (0 - 37,5 µg/mL) em tampão HEPES (20 nmol/L, pH 7,4) durante 16 horas a 37 °C e protegido da luz. O eletroforese foi conduzida durante 60 min a 70 V num gel de agarose a



0,8% em tampão Tris-borato-ácido etilenodiaminotetracético (pH 8,3). O brometo de etídio foi usado para corar o gel e obter bandas que representaram o perfil de violação no DNA. As bandas foram quantificadas por análise de densitometria usando o software Image J 1.47 (NIH, EUA) e classificadas em forma intacta super-enrolada (FI), circular aberta (ruptura de uma única linha - FII) e forma linear (ruptura da dupla cadeia - FIII).

## 2.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

### 2.6.1 Animais

Camundongos Balb/c isogênicos fêmeas com peso de  $20 \pm 2$  g ( $n = 32$ ) foram alojados em condições controladas (12 h de ciclo claro-escuro,  $22 \pm 2$  °C, 60 % de umidade do ar) e livre acesso a alimentos padrão de laboratório e água. Os animais foram aclimatados durante pelo menos 5 dias antes do primeiro tratamento. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os requisitos legais apropriados para a espécie (publicação NIH nº 80-23, revisada em 1978) e com a aprovação do comitê de ética local (CEUA / UFSC - protocolo PP00784). Testes anteriores foram realizados para selecionar as doses máximas seguras de extrato da casca de noz de pecã (20, 40 e 100 mg/kg/dia).

### 2.6.2 Avaliação do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich e análise da sobrevida

A indução do tumor ascítico de Ehrlich foi realizada de acordo com o método de GRINEVICIUS et al. (2016). Camundongos (Balb/c, fêmeas, 65 dias,  $22,0 \pm 0,5$  g) foram inoculados no abdômen (200  $\mu$ L,  $5 \times 10^6$  células de Ehrlich). O dia da inoculação foi considerado dia zero e nesta data todos os animais foram pesados (g) e a circunferência abdominal foi medida (cm). Após 24 h, os animais foram divididos em 2 grupos ( $n = 16$ , cada grupo): um grupo controle negativo tratado apenas com água (50  $\mu$ L por gavagem) e um grupo de teste que recebeu doses do extrato da casca de noz de pecã (50  $\mu$ L 20 mg/kg/ dia por gavagem) a

cada 24 horas durante 9 dias. O crescimento tumoral foi determinado utilizando a seguinte equação:

Inibição do crescimento do tumor (%) = [(variação na circunferência da cintura do grupo tratado x 100) / variação na circunferência da cintura do grupo controle] - 100.

No 10º dia, seis camundongos de cada grupo foram eutanaziados e as suspensões de células peritoneais foram coletadas para análise posterior.

O restante dos animais foram mantidos vivos para avaliar parâmetros de sobrevivência de acordo com KAPLAN, MEIER (1958). A porcentagem de aumento de sobrevida foi calculada da seguinte forma:

Tempo médio de sobrevivência (MST) = dia da primeira morte + dia da última morte / 2 (1)

Aumento da vida útil (% ILS) = [(MST do grupo tratado / MST do grupo de controle) - 1] x 100 (2)

### **2.6.3 Avaliação da morte celular por apoptose e parada do ciclo celular no carcinoma ascítico de Ehrlich**

A morte celular foi avaliada com tumor ascítico de Ehrlich ( $5 \times 10^6$  células) de camundongo do grupo controle negativo e do grupo tratado. Uma solução corante de brometo de etídio e laranja acridina foi utilizada como descrita na análise *in vitro*.

A parada do ciclo celular foi avaliada usando células tumorais de Ehrlich ( $4 \times 10^5$  células) do grupo controle negativo e de camundongos tratados. As células foram lavadas com PBS e fixadas durante a noite em etanol a 70% à -20 °C. Depois disso, as células foram lavadas novamente e ressuspensas na solução de iodeto de propídio/RNase. Em seguida, as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e avaliadas por citometria de fluxo.

### **2.6.4 Ensaio de Cometa**

Uma suspensão de 5 µL de células do tumor ascítico de Ehrlich com 100 µL de agarose com ponto de baixo ponto de fusão (0,75%) foi depositada em uma lâmina contendo agarose (1,5%). As lâminas foram

submersas durante 2 h numa solução de lise (2,5 M NaCl, 10 mM de Tris, 100 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 10% de DMSO e pH 10,0) e depois submetidas a eletroforese horizontal a 300 mA, 8 °C, durante 20 min num tanque com tampão (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM e pH 13). As lâminas foram então neutralizadas (solução de Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5), lavadas e secas a 37 °C. Uma solução de fixação (ácido tricloroacético a 15%, 5% de ZnSO<sub>4</sub> e 5% de glicerol) foi então adicionada durante 10 min. As lâminas foram coradas com iodeto de etídio (0,5 mg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência. Cada núcleo recebeu um valor de fluorescência na faixa 0-4 (unidades arbitrárias: 0-intactas, 4 dano máximo).

### **2.6.5 Ensaio de Imunodeteção**

As proteínas relacionadas ao ciclo celular, apoptose e dano ao DNA foram avaliadas por imuno-eletroforese de acordo com OURIQUE et al. (2015). Em primeiro lugar, as células de tumor ascítico de Ehrlich retirada dos camundongos ( $5 \times 10^6$ ) foram lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,25% Na-desoxicolato e 1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto) suplementado com 1% de protease e 3 % de inibidores do cocktail de fosfatase. Depois, as proteínas foram desnaturadas em tampão Laemmli (Tris-Cl 60 mM, pH 6,8, dodecilsulfato de sódio a 2%, 10% de glicerol, 5% de p-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol). Quantidades equivalentes de proteínas (30 µg) foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posteriormente transferidas por eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. A seguir, foi realizado o bloqueio das membranas em solução de TBS contendo leite em pó desnatado (5%), por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram então incubadas overnight a 4 °C com anticorpos primários específicos (BCL-xL, Bax, p53, CDK2, ciclina A, ciclina B e γH2AX) para cada proteína a ser analisada. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-TWEEN (0,1%) e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (monoclonais ou policlonais) por 1 h. Os blots foram visualizados utilizando-se o sistema SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo

Scientific). Para o controle da carga de proteínas, utilizou-se como marcador a  $\beta$ -actina.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises *in vitro* foram repetidas três vezes de forma independentes. Os ensaios bioquímicos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados com o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. As comparações e os valores  $EC_{50}$  foram feitos usando o software GraphPad Prism (San Diego, EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

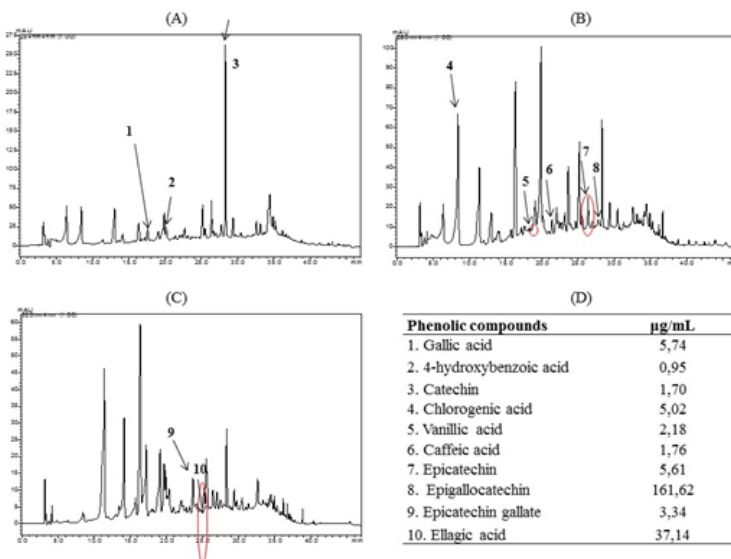
### 3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS NO EXTRATO DA CASCA DE NOZ PECÃ

O extrato obtido mostrou alto conteúdo fenólico (426 mg GAE/g de extrato - ensaio não mostrado). Na Figura 3.1 (A, B e C) estão apresentados os dez compostos fenólicos identificados em diferentes comprimentos de onda (254, 280 e 320nm, respectivamente). Alguns deles (ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido clorogênico, epigallocatequina, epicatequina galato, ácido elágico) foram relatados em estudos anteriores (PORTO et al., 2013; PRADO et al., 2014). Catequina, ácido vanílico, ácido cafeico e epicatequina ainda não haviam sido relatados na literatura para extratos obtidos a partir desta matéria-prima. Dados quantitativos (Figura 3.1D) mostram que a epigallocatequina e o ácido elágico foram os compostos majoritários.

YEN et al. (2002); BERNHAUS et al. (2009); YOU; PARK (2010); e HO et al. (2013), reportaram que o ácido gálico induziu a morte por apoptose em linhas celulares de câncer, como HL-60 (leucemia), Calu-6 e A549 (câncer de pulmão) e HT-29 (câncer de cólon). O efeito antiproliferativo e a atividade pró-apoptótica de ésteres do ácido *p*-hidroxibenzóico foram relatados, indicando que o composto pode inibir a histona desacetilase, uma enzima que têm sido associada ao desenvolvimento de tumores (SEIDEL et al., 2014). Também foram relatados efeitos na expressão de genes de GAN-1 e aumento da morte

celular em células colorretais humanas (HCT-116), bem como inibição de crescimento e apoptose em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço pelo composto fenólico (-)-epicatequina-galato (BAEK et al., 2004; LIM et al., 2006).

**Figura 3.1:** Perfil de compostos fenólicos do extrato da casca de noz pecã.



Nota: (A, B e C): Cromatogramas obtidos nos comprimentos de onda 254 nm, 280 nm e 320 nm, respectivamente por ensaio de HPLC. (D): Dados quantitativos dos compostos fenólicos.

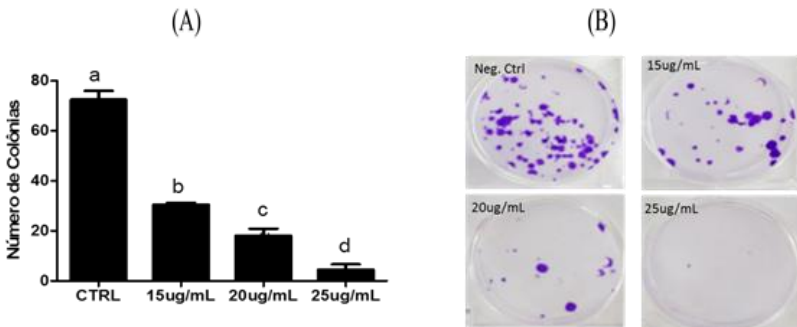
### 3.2 ANÁLISES *IN VITRO* (CÉLULAS MCF-7)

O ensaio de MTT mostrou que o extrato de casca de noz de pecã apresentou citotoxicidade contra células MCF-7 ( $EC_{50} = 74,11 \mu\text{g/mL}$ ). O efeito citotóxico nas células MCF-7 pode ser atribuído aos constituintes polifenólicos do extrato da casca de noz pecã. LI et al. (2013), apresentaram resultados semelhantes em relação à citotoxicidade em células MCF-7 ( $EC_{50} = 88,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) ao avaliar os efeitos do extrato

da casca de frutos de espinheiro ricos em polifenóis. Por outro lado, observou-se um  $EC_{50}$  de 349,6  $\mu\text{g/mL}$  em células 3T3. Este resultado, que é 4,7 vezes maior do que o encontrado para células MCF-7, indica um baixo potencial citotóxico ( $p < 0,05$ ) do extrato da casca de noz pecã, em células não cancerosas.

A Figura 3.2 (A e B) mostra o efeito antiproliferativo no crescimento de células MCF-7, reforçando a atividade citotóxica do extrato da casca de noz pecã. A redução do número de unidades formadoras de colônias foi dependente da dose e maior quando comparado com células não tratadas ( $p < 0,05$ ). Após o tratamento das células durante 24 horas com o extrato, a maior dose testada (25  $\mu\text{g/mL}$ ) foi capaz de inibir 93% do crescimento das células MCF-7.

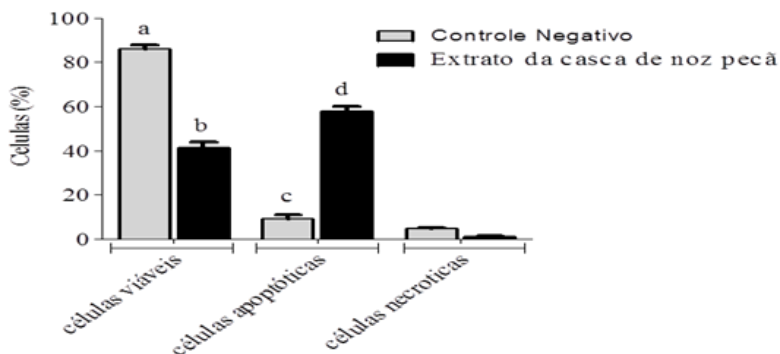
**Figura 3.2 (A e B):** dados quantitativos e imagem de formação de colônias, respectivamente, da atividade antiproliferativa contra células MCF-7 tratadas durante 24 horas com extrato da casca de noz pecã.



Nota: *a*, *b*, *c* e *d* indicam diferenças estatísticas comparadas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ )

A Figura 3.3 mostra que o extrato da casca de noz pecã aumentou o número de células apoptóticas (cerca de 6,2 vezes) em comparação com o grupo controle negativo, diminuindo a viabilidade celular em torno de 52%. Uma pequena quantidade de células necróticas foi observada no grupo tratado, mas em nível insignificante, quando comparado com o grupo controle negativo.

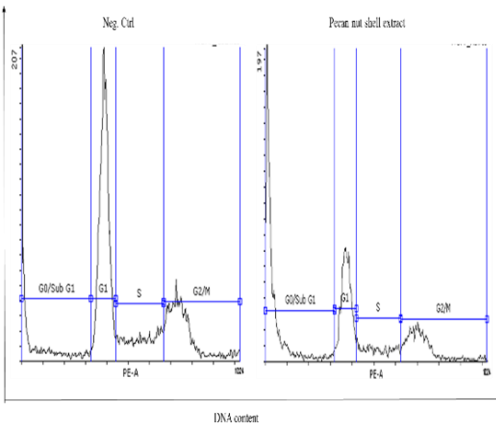
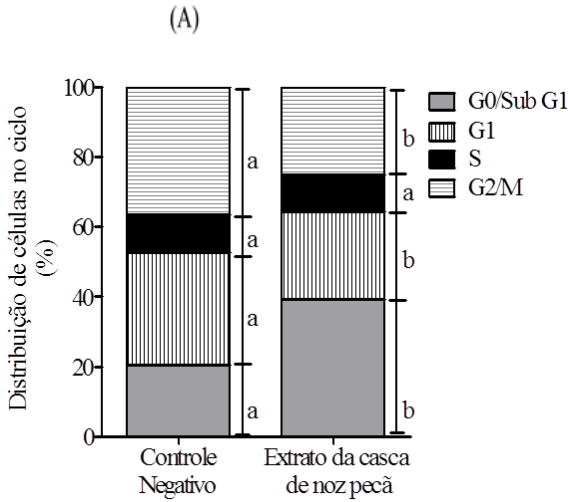
**Figura 3.3:** Tipo de morte celular em células MCF-7 (tratamento com 44,4  $\mu\text{g/mL}$  de extrato da casca de pecã)



Nota: *a* e *b* denotam diferenças estatísticas em células viáveis; *c* e *d* denotam diferenças estatísticas em células apoptóticas ( $p < 0,05$ ).

A exposição das células MCF-7 ao extrato da casca de noz pecã, resultou em um aumento acentuado na proporção de células apoptóticas (Figura 3.3). Assim, a apoptose celular poderia explicar a atividade antiproliferativa dependente da dose observada após o tratamento com o extrato (Figura 3.2). Além disso, observou-se menor número de células na fase G1 e G2/M nas células tratadas com extrato da casca de noz de pecã, quando comparado com o grupo de controle negativo (Figura 3.4 A e B) ( $p < 0,05$ ). A parada do ciclo celular, observada na fase G1, pode ser indicativa de efeito inibitório dos compostos fenólicos do extrato da casca de noz pecã em proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (CHEN et al., 2015).

**Figura 3.4:** Porcentagem de células nas fases do ciclo celular de células MCF-7 (tratamento com 44,4 µg/mL de extrato da casca de pecã)



Nota: *a* e *b* indicam diferenças significativas entre o controle negativo e o grupo tratado em cada fase do ciclo celular ( $p < 0,05$ )

LI et al. (2016) mostraram que um extrato obtido a partir de chá verde, rico em compostos fenólicos, também bloqueou o ciclo celular na

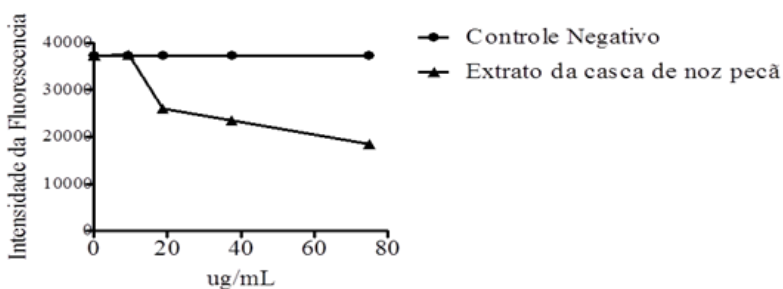


fase G0/SubG1 induzindo a morte apoptótica. Os autores atribuíram os resultados à regulação positiva da p53, redução da expressão de CDK2, aumento na relação Bax/Bcl-2 e ativação de caspase-3 e -9.

### 3.3 INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS DO EXTRATO DA CASCA DE NOZ PECÃ COM DNA

A intercalação, os danos e a fragmentação do DNA são mecanismos associados à atividade antitumoral de diversas substâncias. A Figura 3.5 mostra que, quando a concentração de extrato da casca de noz de pecã foi aumentada, a fluorescência do iodeto de etídio diminuiu. Substâncias que intercalam com DNA, competem e deslocam o iodeto de etídio causando redução na fluorescência. Desta forma, o mecanismo associado ao efeito antitumoral dos extratos da casca de noz pecã, mostrados nos ensaios anteriores, provavelmente foi a intercalação dos extratos com o DNA, como observado com a baixa intensidade de fluorescência no ensaio de CT-DNA.

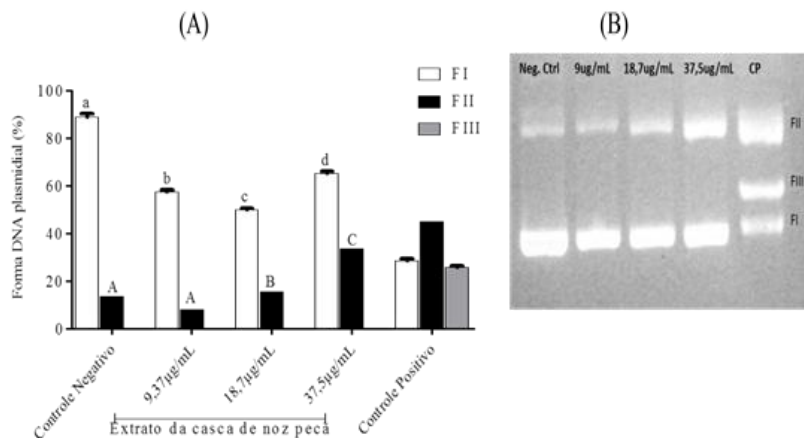
**Figura 3.5:** Efeito da intercalação de compostos do extrato da casca de noz pecã com CT-DNA.



A análise do DNA plasmidial mostrou que o extrato da casca de noz pecã causou danos no DNA. Três diferentes formas de DNA plasmidial podem ser encontradas correspondendo ao DNA intacto, com conformação super enrolada, com uma quebra simples em apenas uma fita da dupla hélice ou uma maior fragmentação quando ambas as fitas do DNA são danificadas. Portanto, danos e fragmentação resultam na modificação da forma superenrolada (FI) do DNA para uma forma de

anel (FII) ou planar (FIII), respectivamente (KVIECINSKI et al., 2011). A migração eletroforética em agarose mostrou que o extrato da casca de noz pecã causou dano no DNA plasmidial em uma concentração de 18,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 3.6). As concentrações do extrato da casca de noz pecã necessárias para causar danos ao DNA foram menores que as relatadas por KVIECINSKI et al. (2011) para extratos de *Bidens pilosa* Linné que também contém flavonóides.

**Figura 3.6:** Imagem quantitativa e eletroforese de dano ao DNA plasmidial.



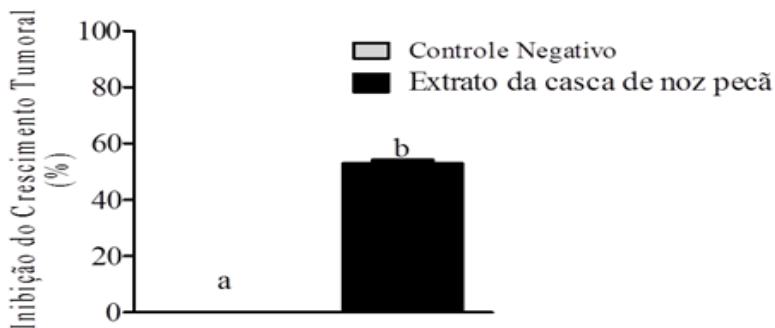
Notas: *a*, *b*, *c* e *d* indicam diferenças estatísticas na forma FI comparadas entre os tratamentos; e *A*, *B* e *C* indicam diferenças estatísticas na forma FII comparadas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Controle negativo = DNA plasmidial sem tratamento com extrato da casca de noz pecã; Controle positivo (PC) = amostra de DNA plasmidial com formas FI, FII e FIII.

### 3.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

O tratamento com extrato da casca de noz pecã causou 52% de inibição no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (Figura 3.7) e um aumento de 67% no tempo de sobrevivência em camundongos tratados com o extrato (Figura 3.8). O tempo médio de vida foi significativamente maior para o grupo que recebeu o extrato da casca de noz pecã (20,2 dias) quando comparado com o grupo controle negativo (12,1 dias). Estes resultados podem estar associados a uma diminuição

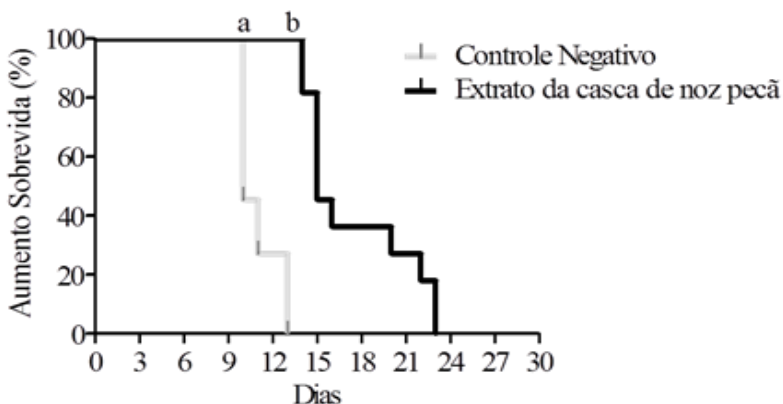
da viabilidade celular. KENNEDY et al. (1999, 1998) relataram que o extrato de chá verde foi capaz de diminuir a viabilidade da célula ascítica de Ehrlich em camundongos.

**Figura 3.7:** Inibição do crescimento tumoral em camundongos tratados durante 9 dias com extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg).



Nota: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas entre grupo controle negativo e grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

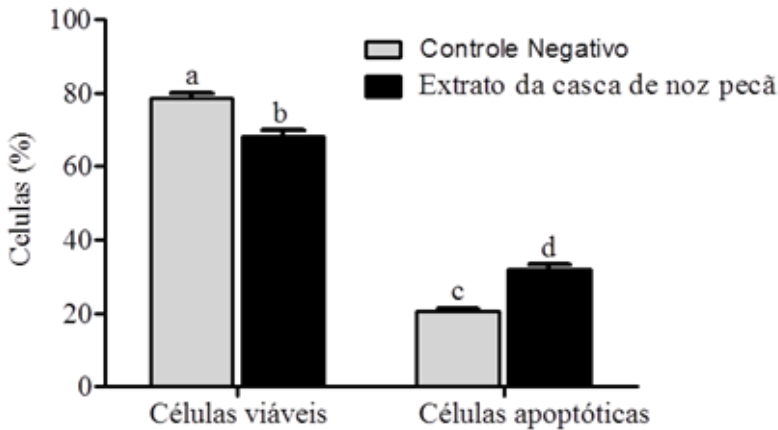
**Figura 3.8:** Sobrevida camundongos com tumor ascítico de Ehrlich tratados durante 9 dias com extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg)



Nota: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas entre grupo controle negativo e grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

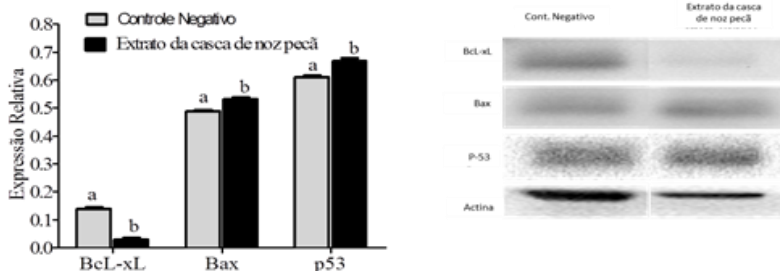
A Figura 3.9 mostra que a apoptose aumentou 55% em células de tumor ascítico de Ehrlich de animais tratados com extrato da casca de noz pecã, em comparação com células de animais do grupo controle negativo. O tratamento com extrato da casca de noz aumentou 9% a expressão de proteínas Bax e p53 (uma classe de proteínas pro-apoptóticas). Em contraste, a Bcl-XL, uma proteína anti-apoptótica, teve sua expressão reduzida em 78% (Figura 3.10A e B). Os resultados indicaram que o extrato da casca de noz pecã têm um efeito modulador na classe de proteínas pró e anti-apoptóticas induzindo a morte celular através da apoptose.

**Figura 3.9:** Efeito do extrato da casca de noz pecã (20mg/kg) na morte de células de tumor ascítico de Ehrlich



Notas: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas em células viáveis entre o controle negativo e o grupo tratado; e *c* e *d* indicam diferenças estatísticas em células apoptóticas entre o controle negativo e o grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

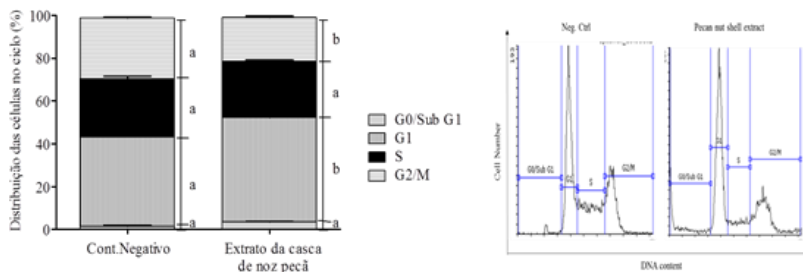
**Figura 3.10:** Imagem de eletroforese e dados quantitativos de proteínas reguladoras do processo de morte celular



Notas: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas entre o controle negativo e o grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

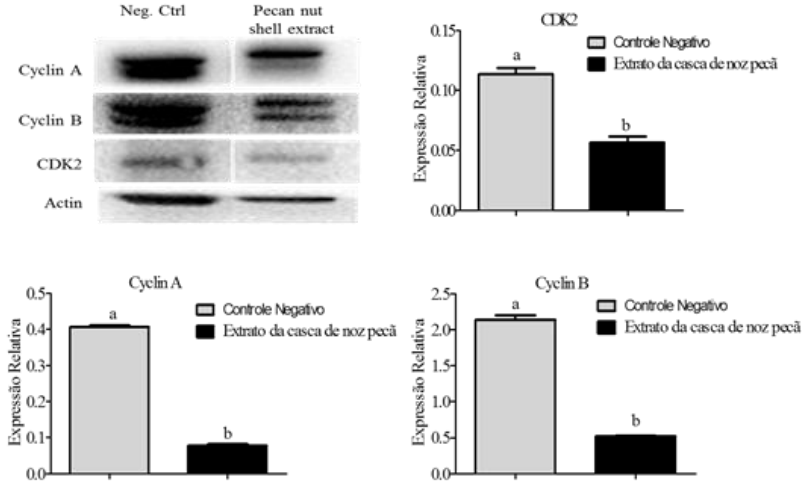
A Figura 3.11 mostra que o tratamento com extrato da casca de noz pecã aumentou significativamente o número de células tumorais em G1 (17%) e diminuiu significativamente as células em fase G2/M (27%). A Figura 3.12 (B, C e D) mostra que os tratamentos com extrato da casca de noz de pecã diminuiram a expressão de proteínas do ciclo celular, como ciclina A, ciclina B e CDK2, que são proteínas-chave envolvidas na regulação e manutenção do ciclo celular (KASTAN; BARTEK, 2004).

**Figura 3.11:** Análise do ciclo celular realizada em células de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos tratados com extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg).



Nota: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas comparadas entre o controle negativo e o grupo tratado em cada fase do ciclo celular ( $p < 0.05$ ).

**Figura 3.12:** Imagem de eletroforese e dados quantitativos de proteínas reguladoras do ciclo celular: ciclina A, ciclina B e CDK2.



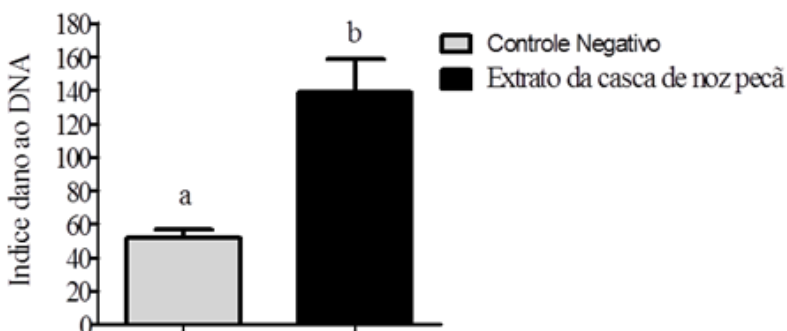
Notas: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas comparadas entre o controle negativo e os grupos tratados ( $p < 0,05$ ).

A baixa expressão das proteínas ciclina A, ciclina B e CDK2, encontrada no grupo tratado com extrato da casca de noz pecã pode explicar a parada do ciclo celular. Sabe-se que o CDK2 associado à ciclina E regula a progressão de G1 para a fase S. Além disso, a ciclina A se liga ao CDK2 e esse complexo é necessário durante a fase S. Por outro lado, a ciclina B em complexo com CDK1 regula a progressão da fase de mitoses (VERMEULEN et al., 2003).

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa mostraram um dano no DNA de células do tumor ascítico de Ehrlich tratadas com o extrato da casca de noz de pecã (Figura 3.13). A expressão da forma fosforilada de histona H2AX, medida por análise de imuno eletroforese, aumentou indicando danos no DNA nuclear. A fosforilação da histona H2AX, chamada  $\gamma$ H2AX, tem sido amplamente utilizada como um marcador sensível para rupturas da dupla cadeia de DNA (YUAN et al., 2010). A Figura 3.14 mostra que o extrato da casca de noz de pecã aumentou a expressão relativa da proteína fosforilada correspondente a

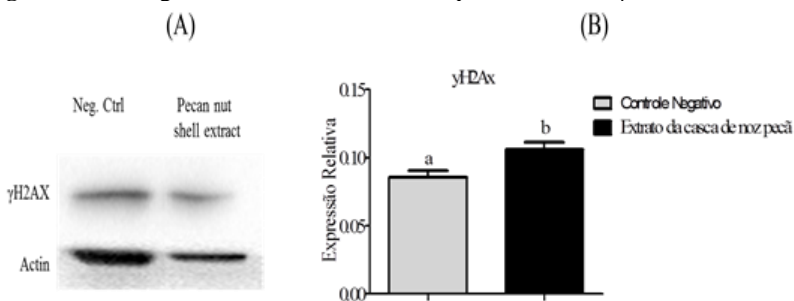
$\gamma$ H2AX. Em consonância com estas descobertas, o ensaio de cometa mostrou que o extrato de casca de noz pecã induziu a fragmentação do DNA e aumentou a fragmentação do DNA em aproximadamente 2 vezes (Figura 3.13). Esses resultados suportam a hipótese de que o possível mecanismo antitumoral do extrato da casca de noz pecã foi o dano ao DNA das células tumorais.

**Figure 3.13:** Efeito do extrato da casca de noz pecã (20 mg/kg) sobre o dano ao DNA das células de tumor ascítico de Ehrlich.



Notas: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas comparadas entre controle negativo e grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

**Figure 3.14:** Imagem de eletroforese e dados quantitativos de  $\gamma$ H2AX.



Notas: *a* e *b* indicam diferenças estatísticas comparadas entre controle negativo e grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

A associação entre compostos fenólicos e atividade antitumoral tem sido relatada em muitos estudos. A morte apoptótica induzida pelo ácido tânico em células de leucemia mieloide aguda (CHEN et al., 2009) suprimiu o tumor da pele, impediu o tumor hepático (NEPKA et al., 1999) e aumentou a sobrevivência de camundongos com tumores singênicos (KOIDE et al., 1999). O ácido galico demonstrou potencial para controlar a metástase tumoral no adenocarcinoma de estômago (HO et al., 2010) uma atividade pró-apoptótica em células de câncer de leucemia (FABIANI et al., 2011) e atividade antiproliferativa em células de câncer de mama (LUO et al. 2011, LIU et al., 2012). Ácido cafeico, ácido clorogênico, catequina e epicatequina mostraram atividades antiproliferativas contra células de câncer de mama e fígado.

#### 4. CONCLUSÃO

O extrato da casca de noz de pecã, rico em compostos fenólicos, mostrou atividade antitumoral contra células de câncer de mama humano MCF-7, diminuindo a viabilidade das células, aumentando a morte celular pela apoptose e bloqueando o ciclo celular. O extrato da casca de noz pecã também aumentou a sobrevivência de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich. A estimulação de proteínas-chave envolvidas na regulação da morte celular e do ciclo celular foi provavelmente o mecanismo para os efeitos observados. Além disso, o extrato interagiu com DNA mostrando que pode causar danos no DNA em células tumorais. Os resultados indicam que o extrato da casca de noz pecã apresentou efeito contra o desenvolvimento de células tumorais e pode ser considerado como uma alternativa ao tratamento de alguns tumores.

#### REFERÊNCIAS

ABDALLAH, H. M.; SALAMA, M. M.; ABD-ELRAHMAN, E. H.; EL-MARAGHY, S. A. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin- induced diabetic rats. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 337–341, 2011.

BAEK, S. J.; KIM, J.-S.; JACKSON, F. R.; et al. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and



apoptosis in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 12, p. 2425–2432, 2004.

BENVEGNÚ, D.; BARCELOS, N.; BOUFLEUR, N.; et al. Protective Effects of a By-Product of the Pecan Nut Industry (*Carya illinoensis*) on the Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats *Carya illinoensis* Protects Against Cyclophosphamide- Induced Toxicity. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 29, n. 3, p. 185–197, 2010.

BENVEGNO, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; ROVERSI, K.; et al. Aqueous extract of pecan nut shell (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) exerts protection against oxidative damage induced by cyclophosphamide in rat testis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 32, n. 4, p. 329–341, 2013.

Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579785>> . .

BRAZIL – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. A cultura da noqueira pecã (*Carya illinoensis*). , 1990.

BURIN, V. M.; ARCARI, S. G.; COSTA, L. L. F.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Determination of Some Phenolic Compounds in Red Wine by RP-HPLC: Method Development and Validation. **Journal of chromatographic science**, v. 49, n. 8, p. 647–651, 2011.

CALL, R. E.; GIBSON, R.; KILBY, M. W. **Pecan Production Guidelines For Small Orchards And Home Yards**. 2006.

CHEN, C.; WANG, M.-L.; JIN, C.; et al. Cordyceps militaris polysaccharide triggers apoptosis and G0/G1 cell arrest in cancer cells. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, p. 433–438, 2015.

CHEN, K. S.; HSIAO, Y. C.; KUO, D. Y.; et al. Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. **Leukemia Research**, v. 33, n. 2, p. 297–307, 2009.

FABIANI, R.; ROSIGNOLI, P.; BARTOLOMEO, A. DE; et al. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1249–1255, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>. .

HO, H. H.; CHANG, C. SEN; HO, W. C.; et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- $\kappa$ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8–9, p. 2508–2516, 2010.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.

KENNEDY, D. O.; MATSUMOTO, M.; KOJIMA, A.; MATSUI-YUASA, I. Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols in Ehrlich ascites tumor cells. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 122, p. 59–71, 1999.

KENNEDY, D. O.; NISHIMURA, S.; HASUMA, T.; et al. Involvement of protein tyrosine phosphorylation in the effect of green tea polyphenols on Ehrlich ascites tumor cells in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 110, p. 159–172, 1998.

KOIDE, T.; KAMEI, H.; HASHIMOTO, Y.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M. Tannic acid raises survival rate of mice bearing syngeneic tumors. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 231–234, 1999.

KVIECINSKI, M. R.; BENELLI, P.; FELIPE, K. B.; et al. SFE from *Bidens pilosa* Linne to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 243–248, 2011.

LI, T.; ZHU, J.; GUO, L.; et al. Differential effects of polyphenols-enriched extracts from hawthorn fruit peels and fleshes on cell cycle and apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1008–1018, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.050>>. .

LI, W.; HE, N.; TIAN, L.; SHI, X.; YANG, X. Inhibitory effects of polyphenol-enriched extract from Ziyang tea against human breast cancer MCF-7 cells through reactive oxygen species-dependent mitochondria molecular mechanism. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1–12, 2016.

LIM, Y. C.; LEE, S. H.; SONG, M. H.; et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 18, p. 3260–3266, 2006.

LIU, X.; ZHAO, M.; WU, K.; et al. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 685–690, 2012.

LUO, W.; ZHAO, M.; YANG, B.; et al. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 277–282, 2011.

MALIK, N. S. A.; PEREZ, J. L.; LOMBARDINI, L.; et al. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 13, p. 2207–2213, 2009.

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

MÜLLER, L. G.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; et al. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1–2, p. 165–171, 2013. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.08.002>>. .

NEPKA, C.; SIVRIDIS, E.; ANTONOGLU, O.; et al. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. **Cancer Letters**, v. 141, n. 1–2, p. 57–62, 1999.

OURIQUE, F.; KVIECINSKI, M. R.; FELIPE, K. B.; et al. DNA

damage and inhibition of akt pathway in MCF-7 cells and Ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

PORTO, L. C. S.; SILVA, J. DA; FERRAZ, A. D. B. F.; et al. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 579–85, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831307>>. Acesso em: 7/1/2015.

PRADO, A. C. P.; MANION, B. A.; SEETHARAMAN, K.; et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64–73, 2013.

PRADO, A. C. P.; SILVA, H. S.; SILVEIRA, S. M.; et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell. **Industrial Crops & Products**, v. 52, p. 552–561, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.031>> .

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95–100, 2008.

ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>> .

SEIDEL, C.; SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. **Cancer Letters**, v. 343, n. 1, p. 134–146, 2014. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.026>>. .

SILVA, M. J. D.; CARVALHO, A. J. S.; ROCHA, C. Q.; et al. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 64–69, 2014. South African Association of Botanists. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629914000532>>. .

SILVEIRA, V. C. DA; BENEZRA, H.; LUZ, J. S.; et al. Binding of oxindole-Schiff base copper(II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1692–1703, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.016>>. .

SOUZA GRINEVICIUS, V. M. A. DE; KVIECINSKI, M. R.; SANTOS MOTA, N. S. R.; et al. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 139–147, 2016.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 337–347, 2001.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473–485, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011>>. .

VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R., BERNEMAN, Z. N.; VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. VAN; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, 2003.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241–1249, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606005796>>. Acesso em: 18/12/2014.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**, (pp. 39 – 45). New York, USA: Chapman & Hall, 1994.

YUAN, J.; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3717–3724, 2010.

**CAPITULO 4: EXTRATOS DA CASCA DE NOZ PECÃ [*Carya illinoensis* (WANGEH) C. KOCK] PREVINEM O DESENVOLVIMENTO DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich EM CAMUNDONGOS BALB/C.**

Artigo submetido para publicação:

Pecan nut shell extract [*Carya illinoensis* (Wangeh) C. Kock] prevent development of Ehrlich ascites tumor in Balb/C mice.

**RESUMO**

Casca de noz pecã é uma fonte de vários compostos fenólicos já identificados, como ácido tânico, gálico, clorogênico, vanílico, cafeico, epicatequina e epicatequina galato. Esses compontos conferem ao extrato alta atividade antioxidante. Sabe-se que um ambiente oxidativo pode desencadear o câncer, assim o aumento no consumo de antioxidantes na dieta pode prevenir o desenvolvimento de tumores. O objetivo deste estudo foi analisar se o pré tratamento com extratos da casca de noz pecã previnem o desenvolvimento de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos Balb/C. Para isso, camundongos foram divididos em grupos e pré tratados por uma, duas e três semanas com extratos aquoso e hidroalcolico da casca de noz pecã. Após o período de tratamento, foi inoculado em cada animal células do tumor ascítico de Ehrlich. As análises mostraram que os grupos que receberam os extratos previamente aumentaram o tempo de sobrevida dos animais e diminuíram o crescimento do tumor. Esses grupos também aumentaram o número de células do tumor em apoptose e pararam o ciclo celular. Um dos mecanismos envolvidos pode ter sido a modulação do sistema antioxidante endógeno e o aumento de dano ao DNA das células tumorais. Os resultados encontrados permitem concluir que os extratos da casca de noz pecã podem prevenir o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich e podem ser uma alternativa para aumentar as defesas antioxidantes.

**Palavras-chave:** prevenção do desenvolvimento de tumor, extrato da casca de noz pecã, modulação antioxidante, aumento de sobrevida.

**Pecan nut shell extract [*Carya illinoensis* (Wangeh) C. Kock]  
prevent development of Ehrlich ascites tumor in Balb/C mice.**

**Short title: Prevention of Ehrlich ascites tumor by pecan nut shell  
extract**

**ABSTRACT**

Pecan nut shell is a source of many phenolic compounds as tannic acid, gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, catechin, epicatechin and epicatechin gallate that has already identify. These components conferred to the extract a high antioxidant activity. It is know that the oxidative environmental may cause carcinogenesis, so the increase of antioxidant consumption in the diet can prevent the development of tumors. The aim of this study was analyze if the pretreatment with pecan nut shell extracts prevent the development of Ehrlich ascites tumor in Balb/C mice. For that, mice were divided in groups and pretreated for one, two and three weeks with pecan nut shell extracts and after the treatment period Ehrlich ascites tumor was inoculated in each animal. Analysis shows that the groups that has received the extracts previously increase the survival time, and decreased the tumor growth. These groups also increased the number of tumor cell in apoptosis and arrest the cell cycle. One of the mechanism involved may be the modulation of the endogenous antioxidant system and the increased in DNA damage. The results found, we conclude that the pecan nut shell extract may prevent de development of Ehrlich ascites tumor and may be an alternative to increase the antioxidant defenses.

**Keywords:** tumor development prevention, pecan nut shell extract, antioxidant modulation, increased survival.

**1. INTRODUCTION**

According the World Health Organization, cancer is characterized as uncontrolled growth of cells that can invade and spread to distant sites of the body. This include a large group of diseases that



can occur in many parts of the body (WHO, 2016). The increase in the growth and proliferation of cells result in a tumor mass that can be classified as malignant when it can cause metastasis or spread to other organs distant that original organ (ISEGHOHI, 2016).

The factor that cause de initiation and progression of cancer can be internal as inherited mutations, hormones, immune conditions and mutations that occur from metabolism, or external factors as tobacco, chemicals, radiations and infectious organisms. These factors can act together or in sequence, resulting in abnormal cell behavior and excessive proliferation (HEJMADI, 2010).

Among the many triggers of cancer are reactive oxygen species (ROS) that can cause oxidative damage to cells. Increased ROS cause oxidative stress, characterized by an imbalance between antioxidant defenses and the generation of reactive species. One of the consequences of oxidative damage caused by this imbalance can be shown as cause of cancer (CHOUDHARI et al., 2014).

Extensive literature shows that oxidative stress was present in all the development phases of tumors. On initiation, the main role of ROS was the oxidative modifications in DNA, as the hydroxylation of guanine in the 8-position (POULSEN et al., 1998). On the promotion phase, the oxidative species can modulate the genes which regulate the proliferation and transcription factors as HIF, p53, NF $\kappa$ B and Nrf2, that control cell growth and cell death (TRACHOOTHAM et al., 2008; GRIGOROV, 2012). And on the last phase of tumorigenesis, ROS can development the angiogenic response and triggering metastasis (MALINS et al., 1996; SHINOHARA et al., 2010; CHOUDHARI et al., 2014).

Therefore, cancer cells use ROS to stimulate proliferation, invasion, migration and angiogenesis. Therefore it is important inhibit the ROS generation to prevent the development of tumors. An alternative to neutralize ROS and reduce the oxidative stress is to increase the antioxidant defenses.

The antioxidant defenses can be characterized as molecules that eliminates the production of free radicals and reactive oxidants. We can count with endogenous antioxidant enzymes (like superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), NADPH: quinone oxidoreductase (NQO) and

thioredoxin reductase (TrxR), also with non-enzymatic antioxidants such as CoQ10, glutathione, non-protein thiols and dietary antioxidant as vitamin C, vitamin E and phenolic compounds (THAPA; GHOSH, 2012; ROLEIRA et al., 2015b).

Phenolic compounds it a secondary metabolites of plants and may found in diverse plant sources (FARAH; DONANGELO, 2006). One of these sources is the pecan nut shell, a sub product of pecan nut industry, that present higher content of total phenolic compounds and antioxidant activity (HILBIG et al 2016 – *in press*).

The antioxidant activity of pecan nut shell extract was already shown preventive effects against oxidative damage induced by chronic ethanol intake, cyclophosphamide drug and cigarette (BENVEGNÚ et al., 2010; RECKZIEGEL et al., 2011; BENVEGNO et al., 2013; MÜLLER et al., 2013). The extract also prevent the development os diabetes, obesity and lipid dysfunction (ABDALLAH et al., 2011; SCHMELING, 2015).

It is know that the increase and regular consumption of phenolic compounds is often linked with health benefits, as those related with anticancer effects (ROLEIRA et al., 2015b). Although popularly used for preventing the development of tumors, phenolic compounds from pecan nut shell have not yet been reported studies investigating these effect. Therefore, the association of phenolic compounds and antioxidant activity of pecan nut shell extract for the prevention of tumors and the mechanisms involved in these effects need to be further discussed.

The objective of this study was investigate the preventive effect of pecan nut shell extract against the development of Ehrlich ascites tumor in Balb/C mice.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 SAMPLES**

Pecan nut shell of the Barton variety from nuts harvested in 2013 was provided by EMATER (Technical Assistance and Rural Extension Company).

## 2.2 EXTRACT PREPARATION

Extracts were obtained using ultrasound-assisted extraction with optimized parameters. For aqueous extract, 1.0 g of dried, grinded and toasted powder from pecan nut shell where diluted in 30 mL of water and sonicated for 35 minutes in 60 °C. And for hydroalcoholic extract, 1.0 g of powder with 30 mL of water:ethanol (80:20 v/v) where sonicated for 25 minutes in 80 °C. After this, the extracts were filtered and dried in spray drying (Büchi Mini Spray – B-290 model) (HILBIG et al., 2016 – *in press*).

## 2.3 ANIMALS

Female isogenic Balb/c mice weighing 20-22 g (n = 84), were housed in standard controlled environmental conditions: room temperature 22±2 °C and 12 h light–dark cycle. All animals had access to standard laboratory food and water ad libitum and were allowed to acclimatize for at least 5 days prior to the first treatment. The procedures were approved by Ethical Committees (CEUA/UFSC - protocol PP00784) and conducted in accordance with legal requirements appropriate to the species (NIH publication #80-23, revised in 1978)

## 2.4 PRETREATMENT AND TUMOR IMPLANTATION

The animals where divided into seven groups (n=12 each group) as follow: Negative control group (NC) - received only water by gavage, Aqueous extract 1 (AE1), Aqueous extract 2 (AE2) and Aqueous extract 3 (AE3)- received by gavage 50 µL of aqueous pecan nut shell extracts (20 mg/kg/day) during one, two and three weeks respectively; Hydroalcoholic extract 1 (HE1), Hydroalcoholic extract 2 (HE2) and Hydroalcoholic extract 3 (HE3) - received by gavage 50 µL of hydroalcoholic pecan nut shell extracts (20 mg/kg/day) during one, two and three weeks respectively.

After each pretreatment with the extracts, the weight (g) and abdominal circumference (cm) of were measured and then a suspension of Ehrlich ascites tumor cell (0.2mL of  $5 \times 10^6$  cells/mice) was inoculated in the animals. Ten days after the tumor inoculation, the weight and

abdominal circumference were measured again for determination of inhibition on tumor growth, according methodology described by Kviecinsky et al. (2011). Six mice from each group were euthanized and peritoneal cell suspensions were collected for later analysis. The survival was evaluated with the remaining animals according to Kaplan and Meier (1958). The percentage of increased life span was calculated as follows:

$$\text{Mean survival time (MST)} = \frac{\text{day of the first death} + \text{day of the last death}}{2} \quad (1)$$

Increased life span %*ILS* =

$$\left[ \left( \text{MST of treated} \frac{\text{group}}{\text{MST}} \text{ of control group} \right) - 1 \right] * 100 \quad (2)$$

## 2.5 ASSESSMENT OF CELL DEATH

The suspension of Ehrlich ascites tumor cells were centrifuged for 10 min at 1000 rpm, and the supernatant was discarded. The cells were suspended in 25  $\mu\text{L}$  of PBS and 10  $\mu\text{L}$  of a dye solution (ethidium bromide/orange acridine 1:1) was added. For the cells count, stained cells were placed into a blade and observed under a fluorescence microscope. For each sample, 300 cells were counted. Data were expressed as the percentage of viable, apoptotic and necrotic cells identified by green, orange and red color respectively.

## 2.6 ASSESSMENT OF CELL CYCLE

Ehrlich ascites tumor cell ( $4 \times 10^5$ ) from each group were washed with PBS and fixed overnight in ethanol 70 % at  $-20^\circ\text{C}$ . The next day, the cells were washed again and propidium iodide/RNase solution were added followed by an incubation for 15 minutes at room temperature. The samples were evaluated by flow cytometry using an LSRFortessa (BD Biosciences). Data was processed using Flowing Software version 2.5.1 (Turku, Finland).

## 2.7 ASSESSMENT OF DNA DAMAGE

DNA damage was evaluated by comet assay where 5  $\mu\text{L}$  of ascites tumor cells and 100  $\mu\text{L}$  of 0.75 % low-melting point agarose was deposited on a blade with agarose (1.5 %). The blades were submerged for 10 hours in a lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, and pH 10.0). After that the blades were subjected to horizontal electrophoresis at 300 mA, 8  $^{\circ}\text{C}$ , for 20 minutes in a tank with buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, and pH 13). After electrophoresis the blades were neutralized (solution of 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), washed and dried at 37  $^{\circ}\text{C}$ . A fixing solution (15 % trichloroacetic acid, 5 %  $\text{ZnSO}_4$ , and 5 % glycerol) was added for 10 min. For analysis, the blades were stained with ethidium iodide (0.5 mg/mL) and analyzed under a fluorescence microscope. Each nucleus received a fluorescence value in the 0–4 range (arbitrary units: 0—undamaged, 4—maximally damaged).

## 2.8 IMMUNOBLOTTING ANALYSIS

Immunoblotting detection of Bax, p53, Bcl-XL, cyclin B and  $\gamma\text{H2AX}$ , were performed according Ourique et al. (2015). First, Ehrlich ascites tumor cells ( $5 \times 10^6$ ) were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 0.25 % Na-deoxycholate and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) supplemented with 1 % protease and 3 % phosphatase cocktail inhibitors. After, the proteins were denatured in Laemmli buffer (60 mM Tris-Cl, pH 6.8; 2 % sodium dodecyl sulfate; 10 % glycerol; 5 %  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.01 % bromophenol blue), and equivalent amounts were submitted to electrophoresis on SDS-PAGE, followed by electroblotting to polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were blocked and then incubated with the rabbit primary polyclonal antibodies. The membranes were washed and incubated with the secondary antibodies for 1 hour. Immunodetection was done using a kit for the chemiluminescence determination.  $\beta$ -actin was used as loading control.

## 2.9 ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT SYSTEM

### 2.9.1 Lipid peroxidation analysis

The assessment of endogenous lipid peroxidation was performed based on the detection of derivatives of oxidation products, that react with thiobarbituric acid (TBARS), especially malondialdehyde (MDA). Such a reaction produces a Schiff base measurably pink coloration. The Ehrlich ascites tumor cells (0.1 mL) were precipitated with 1 ml of TCA (12 %) and mixed with 0.9 mL buffer (60 mM Tris-HCl and 0.1 mM diethylene triamine penta acetic -DPTA, pH 7.4) and 1 mL of thiobarbituric acid (TBA 0.73 %). After this procedure, the samples was maintained in boiling water for 1 hour, cooled at 5 °C for 10 min. and then centrifuged (5.000 g, 5 min). The supernatant of the samples were measured spectrophotometrically using the wavelength of 535 nm. Absorbance were expressed as equivalent to nmol malonaldehyde/mg protein.

### 2.9.2 Reduced glutathione (GSH) content

The content of reduced glutathione (GSH) was analyzed for determination of non-protein tiols. The experiment was conducted using 10  $\mu$ L of Ehrlich ascites tumor cells samples precipitated in TCA (12 %), using 190  $\mu$ L of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 8.0) and 20  $\mu$ L of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; 2.5 mM). For the blank, sample was replaced with TCA (1 %) in distilled water (3:2, v/v). The concentration of thiolate anion (TNB), yellow color is measured spectrophotometrically at 412 nm and the values were expressed in  $\mu$ mol/mg protein.

### 2.9.3 Glutathione reductase (GR) activity

The measurement of GR activity was determined by checks the NADPH oxidation rate due to the formation of GSH, GSSG from the through this enzyme is present in the sample in length wave of 340 nm. First, the reaction was carried out medium containing 25 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0); 8.6 mg of NADPH; 30.6 mg of

oxidized glutathione (GSSG) and DTPA (5 mM, pH 7.0) under cooling. Then, at room temperature, it was added 5  $\mu$ L of Ehrlich ascites tumor cells sample and 200  $\mu$ L of the reaction medium and started the reaction was monitored in 18 cycles for 3 min, resulting in a decreasing curve. The values of the activity of this enzyme were expressed in micromol/min/mg protein.

#### **2.9.4 Glutathione-S-Transferase (GST) activity**

The GST activity was determined spectrophotometrically and relied on the ability of the combination of the GSH and GST, forming a measurable substance at 340 nm, this reaction was monitored for 3 minutes. The sample (5  $\mu$ L) was mixed with 250  $\mu$ L of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and before the reading was added 5  $\mu$ L of a solution containing 1 mL of phosphate buffer and 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB, 0.1 M), and 5  $\mu$ L of a solution 1 ml of distilled water and GSH (0.1 M) in this order. Values were expressed in micromol/min/mg protein.

#### **2.9.5 Glutathione peroxidase (GPx) activity**

Determination of glutathione peroxidase (GPx) was based on the reduction of tert-butylhydroperoxide (t-BuOOH) by oxidation of GSH and GSSG formation which is catalyzed by the enzyme. The measure consists in the oxidation of NADPH recorded by decreasing absorbance, since NADPH is used for regeneration of GSH by the enzyme GR, and this reaction is measured at 340 nm. Thus, NADPH oxidation rate is proportional to the rate of production of GSSG from GSH catalyzed by GPx present in the sample analyzed. In short, there was a reaction medium containing 25 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), 8.6 mg of NADPH, 10 mL of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, 5 mM, pH 7.0) 15 mL of distilled water, 24 mg of GSH and 3.8  $\mu$ L GR 5U, under refrigeration, at the time of assay. Subsequently, at room temperature, was added 5  $\mu$ L of sample and 200  $\mu$ L of the reaction medium and before reading was added 10  $\mu$ L of t-BuOOH, this reaction was monitored in 18s cycles for 3 min. Values are expressed in micromol/min/mg protein.

### 2.9.6 Catalase (CAT) activity

The analysis of the activity of the enzyme catalase (CAT) was measured by rate of decomposition of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 mM) dissolved in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) at 240 nm (AEBI, 1984). Briefly, 5  $\mu\text{L}$  of sample was placed on 200  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer containing  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This activity was measured by the change in optical density every 30 seconds for 3 min. The results were expressed as mmol/min/mg protein.

### 2.10 STATISTICAL ANALYSIS

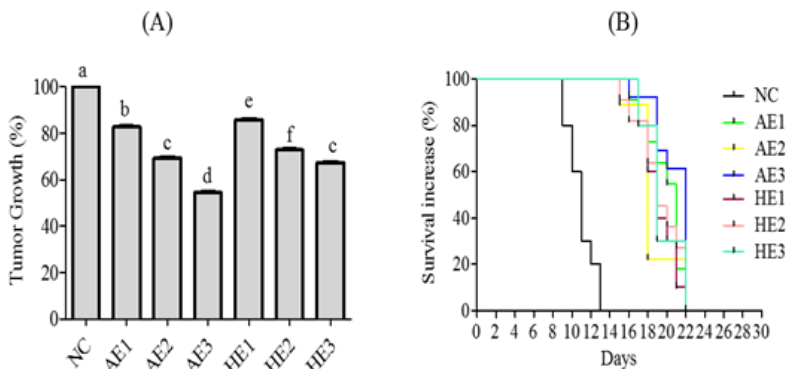
All assays were repeated three times independently. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed using GraphPad Prism software (San Diego, USA) with the ANOVA test followed by the Bonferroni test. Values of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

After analysis was possible to observe a significant inhibition on tumor growth (Figure 4.1A) on the groups pretreated with pecan nut shell extracts. For both, aqueous and hydroalcoholic extracts the inhibition increased with increasing time of pretreatment. The greatest inhibition was observed in the pretreatment with aqueous extract for 3 weeks (46 %).

Figure 4.1B shows that survival on the pretreated groups also significantly increased when compared with negative control. The survival increased was between 63 % to 72 %. Similar results were found in study that available the effects of propolis extract and its polyphenols constituents, with an increased life span between 6 and 150 % (BENKOVIC et al., 2007).



**Figure 4.1:** (A) – Tumor growth inhibition; (B) – Survival increased.

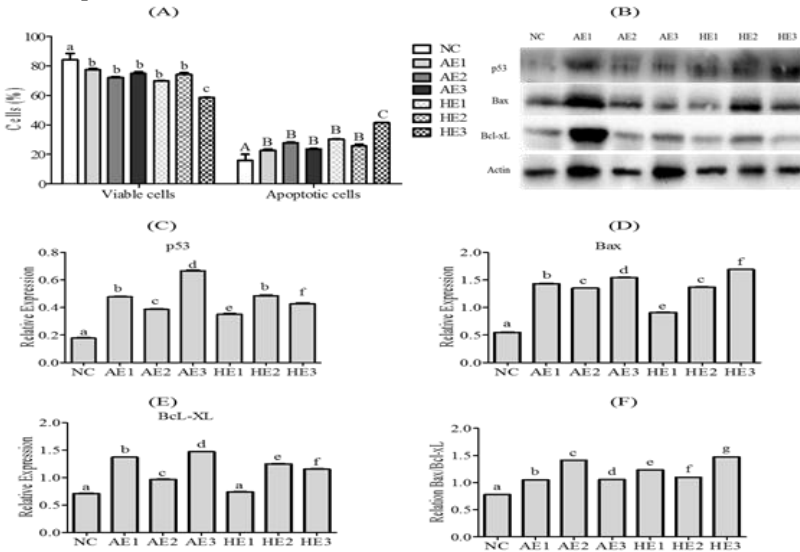
Notes: In (A) different letters, denote statistical differences between groups.  $p < 0.05$  as significant. NC-negative control; AE1, AE2, AE3 – groups that received aqueous pecan nut shell for one, two and three weeks respectively; HE1, HE2, HE3 – groups that received hydroalcoholic pecan nut shell extracts for one, two and three weeks respectively.

The analysis of Ehrlich ascites tumor cell death shows that the pretreatment with pecan nut shell extract, had significant decreased de number of viable cells and increased de number of apoptotic cells when compared with the negative control group (Figure 4.2A). The higher difference was observed on the group treated with hydroalcoholic extract during 3 weeks. Was previously reported that green tea extract, that have similar composition the pecan nut shell extract, elicited growth-inhibitory effects in Ehrlich ascites tumor cells involved a decrease in cell viability and been associated with apoptotic cell death (KENNEDY et al., 2001).

The extracts may had favored the modulation of pro-apoptotic proteins p53 and Bax (Figures 4.2C and D), that had higher expression in comparison with negative control group. Though the expression of BcL-XL (Figure 4.2E), an anti-apoptotic protein, was higher on the groups that received pecan nut shell extract, the relation Bax/BcL-XL (Figure 4.2F) shows the prevalence of Bax expression, indicating higher signaling to cell death by apoptosis. According to BERTINI et al.

(2011), Bax and Bcl-XL can compete for binding to the outer membrane modulating the apoptosis response.

**Figure 4.2:** - (A) Percentage of viable and apoptotic cells. (B) Electrophoresis image of p53, Bax and Bcl-XL proteins. (C, D and E) Quantitative data of regulatory proteins of the cell death process. (F) Relation between Bax and Bcl-XL protein.



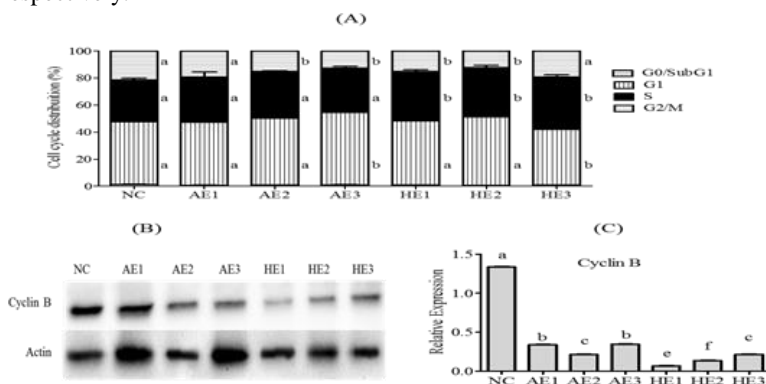
Notes: In (A) *a*, *b*, and *c* denote statistical differences on viable cells and *A*, *B* and *C* denote statistical differences on apoptotic cells between negative control and treated groups, and in (C, D, E and F) *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* and *g* denote statistical differences between negative control and treated groups.  $p < 0.05$  as significant. NC-negative control; AE1, AE2, AE3 – groups that received aqueous pecan nut shell for one, two and three weeks respectively; HE1, HE2, HE3 – groups that received hydroalcoholic pecan nut shell extracts for one, two and three weeks respectively.

The pretreatment with aqueous extract of pecan nut shell can decreased the number of cells on G2 phase after two and three weeks of treatment, and arrested de cycle on G1 phase on the group treated by three weeks (Figure 4.3A). The high activation of p53 protein can cause cell cycle arrest in G1 phase, this protein is recognise as the DNA

guardian and DNA damage leads to G1/S checkpoint control (VERMEULEN, BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003).

On the other hand, the hydroalcoholic extract arrest the cell cycle on S phase in all the groups tested, and decreased the number of cells on G2/M phase after one and two weeks of treatment (Figure 4.3A). The reduction of cells on G2/M phase may explain by the significant lower expression of cyclin B on the groups treated with pecan nut shell extracts (Figures 4.3B and 4.3C). Cyclin B is the protein responsible for the regulation and progression of mitosis (VERMEULEN, BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003).

**Figure 4.3:** (A) Percentage of cells in cycle phases; (B and C) - Electrophoresis image and quantitative data of regulatory proteins cyclin B of the cell cycle, respectively.

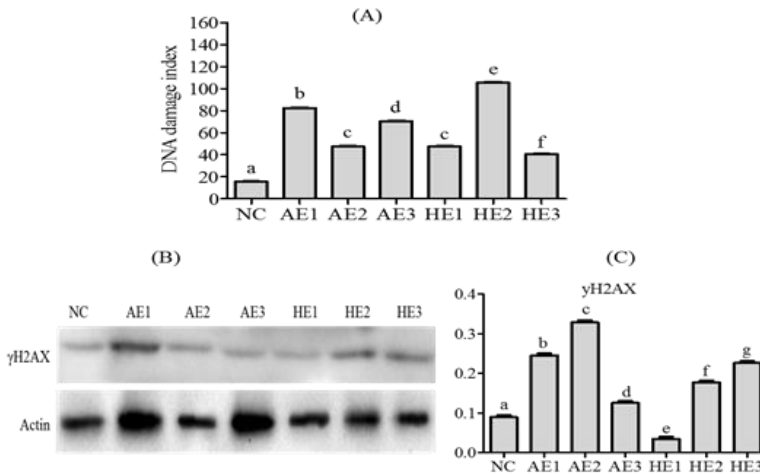


Notes: In (A) *a* and *b* denote statistical differences compared between negative control and treated groups on each cell cycle phase; In (C), *a* and *b* denote statistical differences compared between groups.  $p < 0.05$  as significant. NC - negative control; AE1, AE2, AE3 - groups that received aqueous pecan nut shell for one, two and three weeks respectively; HE1, HE2, HE3 - groups that received hydroalcoholic pecan nut shell extracts for one, two and three weeks respectively.

Damage on DNA can favored the tumor cells death and the cell cycle arrest (BORGES et al., 2009). As shown on Figure 4.4A, the pretreatment with pecan nut shell extracts was able to cause DNA damage in the Erhlich ascites tumor cells on all the treatments tested.

The phosphorylation of histone H2AX also showed to be increased in all groups pretreated with the extracts, with exception of the group that received hydroalcoholic extract for 2 weeks (Figure 4.4C). The presence of  $\gamma$ H2AX it is an marker for DNA double strand breaks, indicating DNA damage (YUAN et al., 2010). DNA damage of the mutated cells of the tumor are an important biological strategy to decrease tumor proliferation. In response to DNA damage, occur activation of programmed cell death (ROOS; KAINA, 2006), as observed on the previous results (Figure 4.2).

**Figure 4.4:** (A) DNA damage index by the comet assay. (B and C) - Electrophoresis image and quantitative data of  $\gamma$ H2AX, respectively.



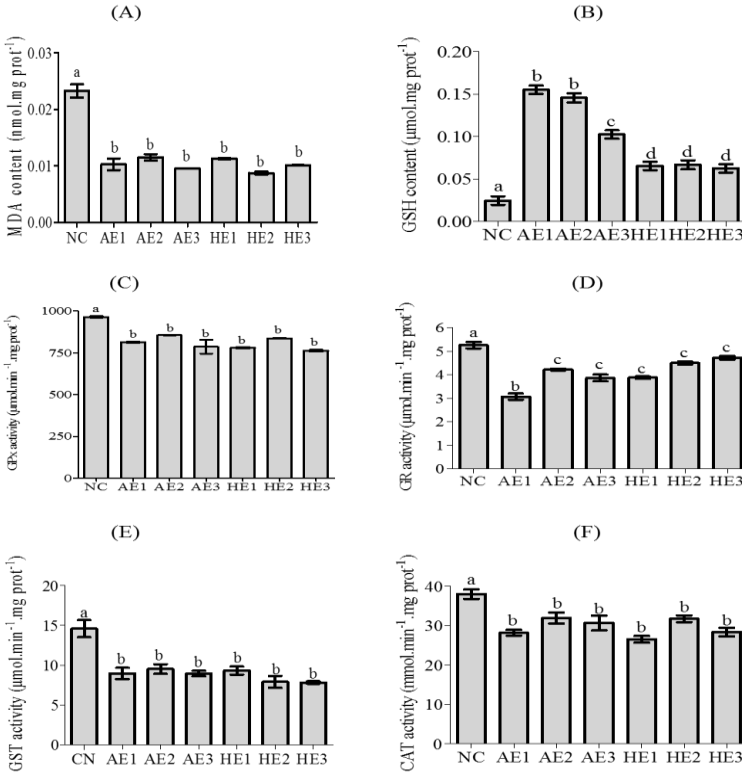
Notes: In (A and C) different letters, denote statistical differences between groups.  $p < 0.05$  as significant. NC-negative control; AE1, AE2, AE3 – groups that received aqueous pecan nut shell for one, two and three weeks respectively; HE1, HE2, HE3 – groups that received hydroalcoholic pecan nut shell extracts for one, two and three weeks respectively.

Oxidative environmental are an important condition to the tumor cells proliferation. ROS can stimulate signal transduction pathways and lead to activation of key transcription factors such as Nrf2 and NF- $\kappa$ B. The altered gene expression patterns evoked by ROS contribute to the

carcinogenesis process (KLAUNIG et al., 2010). Therefore is important prevent the ROS generation to minimize the ideal conditions to tumor installation and proliferation. The pretreatment with pecan nut shell extract was able reduce the lipid peroxidation and consequently ROS generation, in all the groups when compared with the negative control group (Figure 4.5A). Additionally, the extract favored the increased on GSH content, showing an important modulation on this endogenous antioxidant (Figure 4.5B). SREELATHA et al. (2011) shows that extract of *Sesbania grandiflora* significantly decreased the levels of lipid peroxidation and significantly increased the levels of GSH, similar results to those found in this study.

Each antioxidant enzyme of the endogenous system is responsible for determinate activity with the common purpose to neutralize oxidative species. In summary, GR is responsible for the regeneration of oxidized glutathione (GSSG) to the reduced form (GSH). The GPx and CAT are enzymes involved in the neutralization of superoxide ( $O_2^{\cdot -}$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) as catalyze the decomposition of  $H_2O_2$  to  $O_2$  and  $H_2O$  ground state. Finally, GST catalyzes the conjugation of glutathione molecule to various other molecules, and have a key role in intracellular detoxification mechanisms of endo- and xenobiotic compounds (SUN et al., 1997; PASTORE et al., 2003; HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1999).

**Figure 4.5:** Biomarkers of oxidative stress. (A) Damage on lipids - lipid peroxidation. (B) Glutathione content. (C, D, E and F) activity of GPx, GR, GST and CAT respectively.



Notes: In (A until F) different letters, denote statistical differences between groups.  $p < 0.05$  as significant. NC-negative control; AE1, AE2, AE3 – groups that received aqueous pecan nut shell for one, two and three weeks respectively; HE1, HE2, HE3 – groups that received hydroalcoholic pecan nut shell extracts for one, two and three weeks respectively.

Analysis of antioxidants enzymes (GPx, GR, GST and CAT) showed that its activity were lower in all groups pretreated with pecan nut shell extracts when compared with negative control group, indicating that the antioxidant properties of the extracts are acting upon

oxidative conditions caused by the tumor, saving the activity of the endogenous enzymes.

Substances classified as free radical scavengers have been shown to possess antioxidant and pro-oxidants activities, depending on the systems and the dosages used, as shown in both the animal model and tissue cultures systems. These substances may affect influence intracellular levels of glutathione, remove important intracellular defense mechanisms against cytotoxic agents commonly used in chemotherapy, and enhance drug cytotoxicity or promote apoptosis and oxidative DNA damaging effects in tumor cells (BENKOVIC et al., 2007).

#### 4. CONCLUSION

The pretreatment with pecan nut shell extracts were able to prevent the development of Ehrlich ascites tumor in Balb/C mice. The result of the supplementation shows an increased survival and decreasing tumor growth. Probably the antioxidant constituents of the extracts modulated the oxidative environment favoring the signalization to cell cycle arrest and apoptotic death.

#### REFERENCES

ABDALLAH, H. M.; SALAMA, M. M.; ABD-ELRAHMAN, E. H.; EL-MARAGHY, S. A. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin- induced diabetic rats. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 337–341, 2011.

ABIB, R. T.; PERES, K. C.; BARBOSA, A. M.; et al. Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2618–2623, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.006>>. .

AMBRÓSIO, E. **Efeitos metabólicos do Café na Diabetes Mellitus Tipo 2**. 2010.

ANDROUTSOPOULOS, V. P.; PAPAKYRIAKOU, A.; VOURLIOMIS, D.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Dietary

flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 9–20, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.01.009>>. .

AYOUB, M.; CAMARGO, A. C. DE; SHAHIDI, F. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. **Food Chemistry**, v. 197, p. 221–232, 2016. Elsevier Ltd.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>>. .

BAEK, S. J.; KIM, J.-S.; JACKSON, F. R.; et al. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 12, p. 2425–2432, 2004.

BAENA RUIZ, R.; SALINAS HERNANDEZ, P. Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, v. 77, n. 3, p. 202–208, 2014. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.11.010>>. .

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BASGEDIK, B.; UGUR, A.; SARAC, N. Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 526–530, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.022>>. .

BENKOVIC, V.; HORVAT KNEZEVIC, A.; BROZOVIC, G.; et al. Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and



its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 61, n. 5, p. 292–297, 2007.

BENVEGNÚ, D.; BARCELOS, N.; BOUFLEUR, N.; et al. Protective Effects of a By-Product of the Pecan Nut Industry (*Carya illinoensis*) on the Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats *Carya illinoensis* Protects Against Cyclophosphamide- Induced Toxicity. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 29, n. 3, p. 185–197, 2010.

BENVEGNO, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; ROVERSI, K.; et al. Aqueous extract of pecan nut shell (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) exerts protection against oxidative damage induced by cyclophosphamide in rat testis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 32, n. 4, p. 329–341, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579785>>. .

BERNAL, P.; LEMAIRE, S.; PINHO, M. G.; et al. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated -lactam resistance by delocalizing PBP2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 24055–24065, 2010.

BERNHAUS, A.; FRITZER-SZEKERES, M.; GRUSCH, M.; et al. Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 274, n. 2, p. 299–304, 2009. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.020>>. .

BERTINI, I.; CHEVANCE, S.; CONTE, R. DEL; LALLI, D.; TURANO, P. The anti-apoptotic Bcl-x(L) protein, a new piece in the puzzle of cytochrome c interactome. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18329, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3080137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

BHARDWAJ, P.; KHANNA, D. Green tea catechins: Defensive role in

cardiovascular disorders. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 4, p. 345–353, 2013. China Pharmaceutical University. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60051-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60051-5)>. .

BLANCO, E.; HSIAO, A.; RUIZ-ESPARZA, G. U.; et al. Molecular-targeted nanotherapies in cancer: Enabling treatment specificity. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 6, p. 492–503, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2011.10.005>>. .

BOCHI, V. C.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; et al. Polyphenol extraction optimisation from *Ceylon gooseberry* (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, v. 164, n. 2014, p. 347–354, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.031>>. .

BORGES, H. L.; LINDEN, R.; WANG, J. Y. J. DNA damage-induced cell death. , v. 18, n. 1, p. 17–26, 2009.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Falando sobre Câncer do Intestino Instituto Nacional de Câncer, Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Br.** 2003.

BRAZIL \_ EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. A cultura da noqueira pecã (*Carya illinoensis*). , 1990.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian Blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1236–1238, 1980. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60232a056>>. .

CALL, R. E.; GIBSON, R.; KILBY, M. W. **Pecan Production Guidelines For Small Orchards And Home Yards.** 2006.

CAMARGO, A. C. DE; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; BIASOTO, A. C. T.; SHAHIDI, F. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand

breakage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 12159–12171, 2014.

CAMARGO, A. C. DE; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; GALLO, C. R.; SHAHIDI, F. Gamma-irradiation induced changes in microbiological status, phenolic profile and antioxidant activity of peanut skin. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 129–143, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.034>>. .

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 975–983, 2012.

CHEMAT, F.; HUMA, Z. E; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813–835, 2011.

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

CHEMAT, F.; TOMAO, V.; VIROT, M. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. In: S. Otles (Ed.); **Handbook of Food Analysis Instruments**. p.85–94, 2008. New York: CRC Press.

CHEN, C.; WANG, M.-L.; JIN, C.; et al. *Cordyceps militaris* polysaccharide triggers apoptosis and G0/G1 cell arrest in cancer cells. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, p. 433–438, 2015.

CHEN, C.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; et al. Identification and anti-tumour activities of phenolic compounds isolated from defatted adlay ( *Coix lachryma-jobi* L . var . ma-yuen Stapf ). **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 394–405, 2016.

CHEN, K. S.; HSIAO, Y. C.; KUO, D. Y.; et al. Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. **Leukemia Research**, v. 33, n. 2, p. 297–307, 2009.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted

extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.110>>..

CHO, A. S.; JEON, S. M.; KIM, M. J.; et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937–943, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>>..

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; GADBAIL, A. R.; SHARMA, A.; TEKADE, S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. **Oral Oncology**, v. 50, n. 1, p. 10–18, 2014.

DE-MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Metodos para analise de acido clorogenico. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 586–592, 2004.

DIAMANDIS, E. P. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 257, n. 2, p. 157–180, 1997.

DIAZ-MORALLI, S.; TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A.; CASCANTE, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–71, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813000235>>..

DURACKOVA, Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. , v. 8408, p. 459–469, 2010.

ENGEL, J.; ECKEL, R.; KERR, J.; et al. The process of metastasisation for breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 12, p. 1794–1806, 2003.

FABIANI, R.; ROSIGNOLI, P.; BARTOLOMEO, A. DE; et al. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1249–1255, 2011.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125–132, 1990.

GICHNER, T.; POSPÍŠIL, F.; VELEMÍNSKÝ, J.; VOLKEOVÁ, V.; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the ames Salmonella Assay. **Folia Microbiologica**, v. 32, n. 1, p. 55–62, 1987.

GOLUMBIC, C. A. L. V. I. N.; MATTILL, H. A. The Antioxidant Properties of Gallic Acid and Allied Compounds. **J. Am. Oil Chem Soc.**, v. 19, p. 144–145, 1942.

GOPALAKRISHNAN, A.; KONG, A.-N. T. Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: Cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in abnormal cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1257–1270, 2008.

GRIGOROV, B. Reactive Oxygen Species and Their Relation to Carcinogenesis. **Trakia Journal of Sciences**, v. 10, n. 3, p. 83–92, 2012. Disponível em: <[http://tru.uni-sz.bg/tsj/Vol\\_10\\_N\\_3\\_2012/B.Grigorov.pdf%5Cnhttp://connection.ebscohost.com/c/articles/82206879/reactive-oxygen-species-their-relation-carcinogenesis](http://tru.uni-sz.bg/tsj/Vol_10_N_3_2012/B.Grigorov.pdf%5Cnhttp://connection.ebscohost.com/c/articles/82206879/reactive-oxygen-species-their-relation-carcinogenesis)>. .

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_53/v03/pdf/revisao4.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf)>. .

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; et al. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529–1537, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>. .

HEJMADI, M. **Introduction to cancer biology**. 2010.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–6, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048727>>. .

HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 1, p. 1–7, 2005.

HO, H.-H.; CHANG, C.-S.; HO, W.-C.; et al. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF- $\kappa$ B activity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 266, n. 1, p. 76–85, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153558>>. Acesso em: 18/12/2014.

HO, H. H.; CHANG, C. SEN; HO, W. C.; et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- $\kappa$ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8–9, p. 2508–2516, 2010.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 4, p. 276–285, 2003.

INDERJIT; NILSEN, E. T. Bioassays and Field Studies for Allelopathy in Terrestrial Plants: Progress and Problems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3–4, p. 221–238, 2003.

ISEGHOHI, S. O. Cancer stem cells may contribute to the difficulty in treating cancer. **Genes and Diseases**, v. 3, n. 1, p. 7–10, 2016.

JANG, M.; KIM, S. S.; LEE, J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 10, p. e45, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3809361&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

JI, L.; JIANG, P.; LU, B.; et al. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism.

**Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1911–1919, 2013. Elsevier Inc. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.007>>. .

JOSEPH, C. G.; LI PUMA, G.; BONO, A.; KRISHNAIAH, D. Sonophotocatalysis in advanced oxidation process: A short review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 5, p. 583–589, 2009. Elsevier B.V. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.002>>. .

JOSEPH, C. G.; PUMA, G. L.; BONO, A.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; KRISHNAIAH, D. Operating parameters and synergistic effects of combining ultrasound and ultraviolet irradiation in the degradation of 2,4,6-trichlorophenol. **Desalination**, v. 276, n. 1–3, p. 303–309, 2011.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E.; SIEBENHANDL, S.; BAUER, F. The antioxidative properties of *Holy basil* and *Galangal* in cooked ground pork. **Meat Science**, v. 72, n. 3, p. 446–456, 2006.

KALIORA, A. C.; KOGIANNOU, D. A. A.; KEFALAS, P.; PAPASSIDERI, I. S.; KALOGEROPOULOS, N. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; Balancing delight and chemoprevention? **Food Chemistry**, v. 142, p. 233–241, 2014. Elsevier Ltd. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.056>>. .

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.

KENNEDY, D. O.; MATSUMOTO, M.; KOJIMA, A.; MATSUI-YUASA, I. Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols in Ehrlich ascites tumor cells. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 122, p. 59–71, 1999.

KENNEDY, D. O.; NISHIMURA, S.; HASUMA, T.; et al. Involvement of protein tyrosine phosphorylation in the effect of green tea polyphenols on Ehrlich ascites tumor cells in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 110, p. 159–172, 1998.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue

kinetics. **Br. Journal Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KIM, H. S.; QUON, M. J.; KIM, J. A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 187–195, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>>. .

KIM, S. H.; KANG, K. A.; ZHANG, R.; et al. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1319–1326, 2008.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic pathology**, v. 38, n. 1, p. 96–109, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.028>>. .

KOIDE, T.; KAMEI, H.; HASHIMOTO, Y.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M. Tannic acid raises survival rate of mice bearing syngeneic tumors. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 231–234, 1999.

KONDO, T.; OHTA, T.; IGURA, K.; HARA, Y.; KAJI, K. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. **Cancer Letters**, v. 180, n. 2, p. 139–144, 2002.

KÜRBITZ, C.; HEISE, D.; REDMER, T.; et al. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. **Cancer Science**, v. 102, n. 4, p. 728–734, 2011.

KVIECINSKI, M. R.; BENELLI, P.; FELIPE, K. B.; et al. SFE from *Bidens pilosa* Linne to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 243–248, 2011.

LAMPE, J. W. Spicing up a vegetarian diet : chemopreventive effects of phytochemicals. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 579–583, 2003.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for



extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (E. ulmoides). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295–300, 2005.

LI, T.; ZHU, J.; GUO, L.; et al. Differential effects of polyphenols-enriched extracts from hawthorn fruit peels and fleshes on cell cycle and apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1008–1018, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.050>>. .

LI, W.; HE, N.; TIAN, L.; SHI, X.; YANG, X. Inhibitory effects of polyphenol-enriched extract from Ziyang tea against human breast cancer MCF-7 cells through reactive oxygen species-dependent mitochondria molecular mechanism. **Journal of Food and Drug Analysis**, p. 1–12, 2016.

LIM, Y. C.; LEE, S. H.; SONG, M. H.; et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 18, p. 3260–3266, 2006.

LIMA, E. M. DE; KANUNFRE, C. C.; ANDRADE, L. F. DE; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Cytotoxic effect of inositol hexaphosphate and its Ni(II) complex on human acute leukemia Jurkat T cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2081–2088, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.08.018>>. .

LIMA, S. S. **O Cultivo de Noz Pecã no Município de Itaquí-RS: O Estudo de Caso do Sítio Parintins**. 2011.

LIU, X.; ZHAO, M.; WU, K.; et al. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 685–690, 2012.

LIU, Y.; WEI, S.; LIAO, M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 837–843, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.023>>. .

LUO, W.; ZHAO, M.; YANG, B.; et al. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus*

*emblica* L. fruit. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 277–282, 2011.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: A powerful tool for leaching. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.

MA, J.; LUO, X. D.; PROTIVA, P.; et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 983–986, 2003.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 2012.

MALIK, N. S. A.; PEREZ, J. L.; LOMBARDINI, L.; et al. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 13, p. 2207–2213, 2009.

MALINOWSKY, K.; WOLFF, C.; GÜNDISCH, S.; BERG, D.; BECKER, K. F. Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues. **Journal of Cancer**, v. 2, n. 1, p. 26–35, 2011.

MALINS, D. C.; POLISSAR, N. L.; GUNSELMAN, S. J. Progression of human breast. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. March, p. 2557–2563, 1996.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 361–370, 2000.

MARTINS, S.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 88, p. 163–167, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.020>>. .

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MOHAMAD, M.; ALI, M. W.; AHMAD, A. Modelling for extraction of major phytochemical components from *Eurycoma longifolia*.

**Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 21, p. 2572–2577, 2010.

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

MÜLLER, L. G.; PASE, C. S.; RECKZIEGEL, P.; et al. Hepatoprotective effects of pecan nut shells on ethanol-induced liver damage. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1–2, p. 165–171, 2013. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.08.002>>. .

NAIR, S.; LI, W.; KONG, A. N. T. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: Redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 4, p. 459–472, 2007.

NEPKA, C.; SIVRIDIS, E.; ANTONOGLU, O.; et al. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. **Cancer Letters**, v. 141, n. 1–2, p. 57–62, 1999.

NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annual review of biochemistry**, v. 61, p. 441–70, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1497317>>. .

OPARE KENNEDY, D.; KOJIMA, A; HASUMA, T.; et al. Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-dependent activation of mitogenic-activated protein kinases. **Chemico-biological interactions**, v. 134, n. 2, p. 113–133, 2001.

ORO, T.; OGLIARI, P. J.; AMBONI, R. D. D. M. C.; ARELLANO, D. B.; BLOCK, J. M. Evaluación de la calidad durante el almacenamiento de nueces Pecán [ *Carya illinoensis* ( Wangerh .) C . Koch ] acondicionadas en diferentes envases. **Grasas y Aceites**, v. 59, n. 2, p. 132–138, 2008.

OURIQUE, F.; KVIECINSKI, M. R.; FELIPE, K. B.; et al. DNA damage and inhibition of akt pathway in MCF-7 cells and ehrlich tumor

in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, n. 1–2, p. 19–39, 2003.

PORTO, L. C. S.; SILVA, J. DA; FERRAZ, A. D. B. F.; et al. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 579–85, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831307>>. Acesso em: 7/1/2015.

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, 1998. Disponível em: <[http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed4&AN=1998119227%5Cnhttp://sfx.kb.dk.ep.fjerna.dgang.kb.dk/sfx\\_local?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=0959-8278&isbn=&volume=7&issue=1&spage=9&pages=9-16&date=1998&title=European+](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed4&AN=1998119227%5Cnhttp://sfx.kb.dk.ep.fjerna.dgang.kb.dk/sfx_local?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=0959-8278&isbn=&volume=7&issue=1&spage=9&pages=9-16&date=1998&title=European+>)>. .

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 332–340, 2009.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 4, p. 330–335, 2009a.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Phenolic compounds and antioxidant activity of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell extracts. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 323–332, 2009b.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M.

Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 5, p. 458–467, 2009c. Disponível em: <<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/582/596>>. Acesso em: 7/1/2015.

PRADO, A. C. P. DO. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**, 2008. Federal University of Santa Catarina - Brazil.

PRADO, A. C. P.; MANION, B. A.; SEETHARAMAN, K.; et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [ *Carya illinoensis* ( Wangenh ) C . Koch ]. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 64–73, 2013.

PRADO, A. C. P.; SILVA, H. S.; SILVEIRA, S. M.; et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops & Products**, v. 52, p. 552–561, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.031>>. .

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. VAN; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214–1218, 1978. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60219a031>>. .

QUEIROZ, M. L.; VALADARES, M. C.; BINCOLETTO, C.; DIEAMANT, G. C. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 26, n. February, p. 511–25 ST–Ehrlich ascites tumor as a tool in th, 2004.

RAMALHO, S. A.; NIGAM, N.; OLIVEIRA, G. B.; et al. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 155–161, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912005005>>. Acesso em: 18/11/2014.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770–1778, 2011.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>>. .

RILEY, L. B.; DESAI, D. C. The Molecular Basis of Cancer and the Development of Targeted Therapy. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n. 1, p. 1–15, 2009.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95–100, 2008.

ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>>. .

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 440–450, 2006.

ROSA, L. A. D. LA; ALVAREZ-PARRILLA, E.; SHAHIDI, F. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Kernels and Shells of

Mexican Pecan ( *Carya illinoensis* ). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 152–162, 2011.

ROY, S.; SANNIGRAHI, S.; GHOSH, B.; PUSP, P.; ROY, T. Combination therapy of dexamethasone with epigallocatechin enhances tibiotarsal bone articulation and modulates oxidative status correlates with cartilage cytokines expression in the early phase of experimental arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 444–454, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.004>>. .

ŞAHİN, S.; AYBASTIER, Ö.; İŞİK, E. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1361–1368, 2013.

SANTANA, C. M.; FERRERA, Z. S.; PADRÓN, M. E. T.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 298–320, 2009.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; et al. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 861–880, 2002.

SCHULZ, M.; BORGES, G. DA S. C.; GONZAGA, L. V.; et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>>. .

SEIDEL, C.; SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. **Cancer Letters**, v. 343, n. 1, p. 134–146, 2014. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.026>>. .

SERAFINI, M.; TESTA, M. F. Redox ingredients for oxidative stress prevention: the unexplored potentiality of coffee. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 225–229, 2009. Elsevier Inc. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.04.007>>. .

SHAHRZAD, S.; BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 741, n. 2, p. 223–231, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967396001690>>. .

SHINOHARA, M.; ADACHI, Y.; MITSUSHITA, J.; et al. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloprotease-9 production and cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4481–4488, 2010.

SILVA, M. J. D.; CARVALHO, A. J. S.; ROCHA, C. Q.; et al. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 64–69, 2014. South African Association of Botanists. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629914000532>>. .

SILVEIRA, V. C. DA; BENEZRA, H.; LUZ, J. S.; et al. Binding of oxindole-Schiff base copper(II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1692–1703, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.016>>. .

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 985–1015, 2005.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 200–213, 2005.



- SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>>. .
- SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M. DE. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 2007.
- SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 337–347, 2001.
- SREELATHA, S.; PADMA, P. R.; UMASANKARI, E. Evaluation of anticancer activity of ethanol extract of *Sesbania grandiflora* (*Agati Sesban*) against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 984–987, 2011.
- SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, p. 753–758, 2003.
- STERN, H.; KIRK, P. L. Microgram analysis: a solid-liquid extractor and its application to extraction of sugars from plant materials. **Journal Biology Chemistry**, v. 177, p. 43–49, 1949.
- SUN, G. F.; SHIMOJO, N.; PI, J. B.; LEE, S.; KUMAGAI, Y. Gene deficiency of glutathione S-transferase mu isoform associated with susceptibility to lung cancer in a Chinese population. **Cancer letters**, v. 113, n. 1–2, p. 169–172, 1997.
- THAPA, D.; GHOSH, R. Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: Challenges and opportunities. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 10, p. 1319–1330, 2012.
- TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; NILSA, R.-D. V.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxid.redox.signal.**, v. 10, n. 8, p. 1343–1374, 2008.
- TRACHOOTHAM, D.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism

by -phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v. 10, n. 3, p. 241–252, 2006.

TREVIZOL, F.; BENVEGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: Prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 13–18, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.026>>. .

VENKATACHALAM, M. **Chemical Composition of Select Pecan [ *Carya illinoensis* ( Wangenh .) K . Koch ] Varieties and Antigenic Stability of Pecan Proteins**, 2004. FLORIDA STATE UNIVERSITY.

VERA-RAMIREZ, L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; et al. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, n. 3, p. 347–368, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.01.004>>. .

VERÇOSA-JUNIOR, D.; MELO, M. M.; CASSALI, G. D.; DANTAS-BARROS, A. M.; SILVA-JUNIOR, P. G. P. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundogos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 150–154, 2007.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473–485, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011>>. .

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N.; VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. VAN; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, 2003.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars.

**Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1241–1249, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606005796>>. Acesso em: 18/12/2014.

WENG, C. J.; YEN, G. C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 1, p. 76–87, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.001>>. .

WOLIN, M. S. Reactive oxygen species and the control of vascular function. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 296, n. 3, p. H539–H549, 2009.

WORLEY, R. E. Pecan physiology and composition. In C. R. Santerre (Ed.), **Pecan technology**, (pp. 39 – 45). New York, USA: Chapman & Hall, 1994.

YEN, G. C.; DUH, P. DER; TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307–313, 2002.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1356–1362, 2010.

YUAN, J.; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3717–3724, 2010.

ZIECH, D.; ANESTOPOULOS, I.; HANAFI, R.; et al. Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 327, n. 1–2, p. 16–25, 2012. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.025>>. .

ZIEGLER, U. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 124–128, 2004.



## CONCLUSÕES

A análise dos efeitos das variáveis temperatura de extração, razão sólido:solvente, volume de solvente e tempo de extração usando extração assistida por ultrassom e ferramentas estatísticas permitiu obter extratos da casca de noz pecã ricos em compostos fenólicos.

Os extratos obtidos na melhor condição também apresentaram elevados teores de taninos condensados e atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH. E os perfis cromatográficos evidenciaram a presença de 29 e 27 compostos fenólicos no extrato aquoso e hidroalcolóico, respectivamente, indicando que a extração favoreceu a identificação de novos compostos fenólicos além dos já identificados em estudos prévios do grupo.

O extrato aquoso da casca de noz pecã apresenta efeito citotóxico e antiproliferativo sobre células MCF-7 cultivadas *in vitro*;

O efeito citotóxico e antiproliferativo do extrato aquoso em células MCF-7 pode ser associado à capacidade destes extratos em promoverem parada do ciclo celular na fase G0/SubG1 induzindo consequentemente a morte das células por apoptose. Além disso, poderia estar associado ainda à promoção de danos ao DNA como indicado nos ensaios que evidenciaram a capacidade do extrato de intercalar com as bases do DNA e/ou ainda gerar quebra em uma das fitas do DNA.

O extrato aquoso da casca de noz pecã apresentou efeito antitumoral *in vivo* sobre o modelo experimental do carcinoma ascítico de Ehrlich. Tal efeito envolve a indução da parada do ciclo celular e morte por apoptose provavelmente pelo aumento dos níveis das proteínas p53 e Bax e diminuição dos níveis de Bcl-XL, ciclina A, ciclina B e CDK2 responsáveis pela regulação da morte e ciclo celular.

O tratamento de camundongos Balb/C, portadores de tumor ascítico de Ehrlich, com o extrato aquoso também aumentou os níveis da histona  $\gamma$ H2AX, indicando aumento do dano ao DNA das células tumorais.

Os efeitos antitumorais *in vivo* observados com o tratamento com extrato aquoso da noz pecã favoreceram, portanto, o aumento da sobrevida e inibição no desenvolvimento do tumor nos animais com células de Ehrlich.

Animais que receberam extratos aquoso e hidroalcolico durante uma, duas e três semanas e depois foram inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, também aumentaram o tempo de sobrevivência e diminuíram o desenvolvimento do tumor. Evidenciando dessa forma o efeito preventivo dos extratos contra o desenvolvimento de tumores no modelo avaliado.

Entre os mecanismos envolvidos no efeito preventivo dos extratos está a modulação do sistema antioxidante endógeno, aumento do dano ao DNA das células tumorais, inibição do ciclo celular e indução da morte celular por apoptose.

Os efeitos preventivos foram estimulados pela expressão positiva de proteínas responsáveis apoptose (Bax e p53), parada do ciclo celular (ciclina B) e dano ao DNA ( $\gamma$ H2AX).

## ANEXOS

### ANEXO A: TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

#### CERTIFICADO

A Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras - SBOG certifica que o trabalho intitulado **“SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS RETARDAM O EXCESSO OXIDATIVO EM ANIMAIS INOCULADOS COM TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich”** de autoria de **Josiane Hilbig, Luiza Sheyla Evenni Porfirio Will Castro, Rozangela Curi Pedrosa e Jane Mara Block** foi apresentado na forma ORAL no SEMINÁRIO INTERNACIONAL PROCESSAMENTO DE ÓLEOS E GORDURAS: TENDÊNCIAS E DESAFIOS, realizado de 19 a 21 de Agosto de 2015, Florianópolis - SC.



Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras



19 a 21/08/2015  
Florianópolis - SC

SEMINÁRIO INTERNACIONAL  
PROCESSAMENTO DE  
ÓLEOS E GORDURAS  
TENDÊNCIAS E DESAFIOS



**SBBq | IUBMB 2015**

**We hereby certify that the abstract entitled**

**PECAN NUT [CARYA ILLINOINENSIS (WANGENH.) K. KOCH] SHELL  
EXTRACTS PREVENT THE GROWTH OF EHRlich ASCITES TUMOR AND  
DNA DAMAGE**

**by authors: JOSIANE HILBIG (UFSC), JANE MARA BLOCK (UFSC),  
RODRIGO COSTA ZEFERINO (UFSC.), FABIANA OURIQUE DA SILVA  
(UFSC.), VALDELÚCIA M.A.S. GRINEVICIUS (UFSC.), ROZANGELA CURI  
PEDROSA (UFSC.)**

**was presented during the 23rd International Congress of the IUBMB and  
44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and  
Molecular Biology (SBBq) in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, on August  
24th to 28th, 2015.**

**Glaucius Oliva**

Chair of the 23<sup>rd</sup> IUBMB Congress

**Jerson Lima Silva**

President of SBBq





Varrentrappstr. 40-42  
60486 Frankfurt / Main  
Germany  
Tel: +49/69/7917345  
Fax: +49/69/7917564  
info@eurofedlipid.org  
www.eurofedlipid.org

Florence, 30 September 2015

### **Confirmation of Participation and Presentation**

Herewith, we confirm that

Prof. Dr. J.M. Block, UFSC, Florianópolis, BRAZIL  
presented a poster entitled

**"Inhibiting Ehrlich Ascites Tumor Cells in BALB/c Mice by Aquous Extract of Pecan Nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] Shell"**

in the Session: Lipid Oxidation and Antioxidants

The poster was co-authored by:

J. Hilbig, Florianópolis/BR, F.O. Silva, Florianópolis/BR,  
L.S.E.P.W. Castro, Florianópolis/BR, R.C. Pedrosa, Florianópolis/BR

during the 13<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress: Fats, Oils and Lipids: New Challenges in  
Technology, Quality Control and Health, 27<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> September 2015, Florence, Italy

European Federation for the Science  
and Technology of Lipids e.V.  
Euro Fed Lipid

European Federation for the  
Science and Technology of Lipids e.V.  
P.O. Box 90 94 40  
60444 Frankfurt/Main, Germany  
www.eurofedlipid.org



Varrentrapstr. 40-42  
60486 Frankfurt / Main  
Germany  
Tel: +49/69/7917345  
Fax: +49/69/7917564  
info@eurofedlipid.org  
www.eurofedlipid.org

Florence, 30 September 2015

### **Confirmation of Participation and Presentation**

Herewith, we confirm that

Prof. Dr. J.M. Block, , Florianópolis, BRAZIL  
presented a poster entitled

**"Optimisation of Ultrasonic-assisted Extraction of Phenolic Compounds from Pecan Nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] Shell using Response Surface Methodology"**

in the Session: Lipid Oxidation and Antioxidants

The poster was co-authored by:

J. Hilbig, Florianópolis/BR, C.M.O. Muller, Florianópolis/BR,  
R.C. Pedroza, Florianópolis/BR

during the 13<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress: Fats, Oils and Lipids: New Challenges in  
Technology, Quality Control and Health, 27<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> September 2015, Florence, Italy

European Federation for the Science  
and Technology of Lipids e.V.  
Euro Fed Lipid

European Federation for the  
Science and Technology of Lipids e.V.  
P.O. Box 90 04 40  
60440 Frankfurt/Main, Germany  
www.eurofedlipid.org

## ANEXO B: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA ESTUDOS COM ANIMAIS

15062015

ndes.ufc.br/biblioteca/navegacao/Resultados/FD83D7600D462E83057E40046A819?OpenDocument

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**  
PP00784

**Título**

METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRODUTOS (COMPOSTOS) SINTÉTICOS E NATURAIS ( TOXICIDADE AGUDA, ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIANGIÔGENICA, ANTIOXIDANTE, PRÓ-OXIDANTE, HIPOLIPIDEMIANTE)

**Data de Entrada**

20/05/2014

**Resultado:**

Aprovado

Data/Prazo

08/05/2015

**Considerações**

Ofício nº 036/CEUA/PROPESQ/2015

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(s): Prof(a) Dr(a), Rozângela Curi Pedrosa - Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO adendo com a inclusão de novas metodologias em anexo.

Adita-se o Ofício nº 192/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(s): Prof(a) Dr(a) Rozângela Curi Pedrosa - Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dois mil camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Setorial BIO011.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 09/01/2019

Data 08/05/2015

Parecer(s):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#) [Criar Relatório](#)



[Parecer1\\_PP00784.pdf](#) [Parecer2\\_PP00784.pdf](#)



[Adendo Solicitação, Resumidor e Pareceres\\_PP00784.pdf](#) [Adendo Resposta Resumidor e Pareceres Finais\\_PP00784.pdf](#)





## ANEXO C: ARTIGO PUBLICADO \_ JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

Journal of Ethnopharmacology 211 (2018) 256–266



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## Aqueous extract from pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice



Josiane Hilbig<sup>a</sup>, Priscila de Britto Policarpi<sup>b</sup>, Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicus<sup>b</sup>, Nádia Sandrine Ramos Santos Mota<sup>a</sup>, Isabela Maia Toaldo<sup>c</sup>, Marilde Terezinha Bordignon Luiz<sup>c</sup>, Rozangela Curi Pedrosa<sup>b</sup>, Jane Mara Block<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Fats and Oils, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Experimental Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Food Biochemistry, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Phenolic compounds  
Pecan nut shell  
Antitumor effects  
MCF-7 breast cancer cell  
Apoptosis

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** In Brazil many health disorders are treated with the consumption of different varieties of tea. Shell extracts of pecan nut (*Carya illinoensis*), which have significant amounts of phenolic compounds in their composition, are popularly taken as tea to prevent diverse pathologies.

**Aim of the study:** Phenolic compounds from pecan nut shell extract have been associated with diverse biological effects but the effect on tumor cells has not been reported yet. The aim of the current work was to evaluate the relationship between DNA fragmentation, cell cycle arrest and apoptosis induced by pecan nut shell extract and its antitumor activity.

**Materials and methods:** Cytotoxicity, proliferation, cell death and cell cycle were evaluated in MCF-7 cells by MTT, colony assay, differential coloring and flow cytometry assays, respectively. DNA damage effects were evaluated through intercalation into CT-DNA and plasmid DNA cleavage. Tumor growth inhibition, survival time increase, apoptosis and cell cycle arrest were assessed in Ehrlich ascites tumor in Balb/C mice.

**Results:** The cytotoxic effect of pecan nut shell extracts, the induction of cell death by apoptosis and also the cell cycle arrest in MCF-7 cells have been demonstrated. The survival time in mice with Ehrlich ascites tumor increased by 67%. DNA damage was observed in the CT-DNA, plasmid DNA and comet assays. The mechanism involved in the antitumor effect of pecan nut shell extracts may be related to the activation of key proteins involved in apoptosis cell death (Bcl-XL, Bax and p53) and on the cell cycle regulation (cyclin A, cyclin B and CDK2).

**Conclusions:** These results were attributed to the phenolic profile of the extract, which presented compounds such as gallic, 4-hydroxybenzoic, chlorogenic, vanillic, caffeic and diagic acid, and catechin, epicatechin, epigallocatechin and epicatechin gallate. The results indicated that pecan nut shell extracts are effective against tumor cells growth and may be considered as an alternative to the treatment of cancer.



## ANEXO D: NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY QUANTO A POLITICA DE DIREITOS AUTORAIS



**JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY**

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0378-8741

**Biodiversity rights** - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

#### *Author contributions*

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

#### *Declaration of interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information.](#)

#### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

#### *Changes to authorship*

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

#### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring