

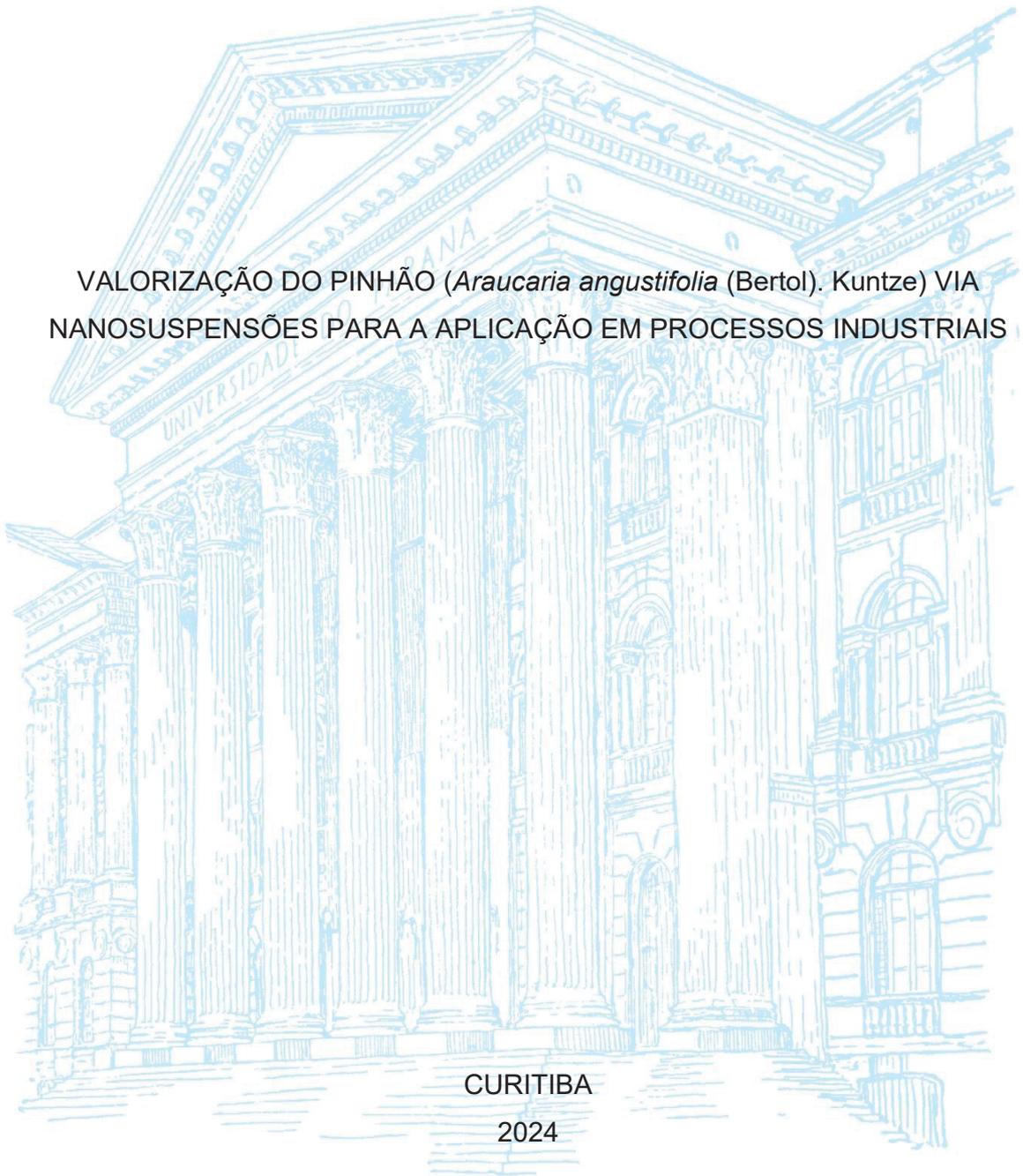
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO CASTRO LEAL

VALORIZAÇÃO DO PINHÃO (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) VIA
NANOSUSPENSÕES PARA A APLICAÇÃO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

CURITIBA

2024



FERNANDO CASTRO LEAL

VALORIZAÇÃO DO PINHÃO (*Araucaria angustifolia* (Bertol). Kuntze) VIA
NANOSUSPENSÕES PARA A APLICAÇÃO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Igarashi Mafra
Coorientadora: Dr.^a Cristiane Vieira Helm

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Leal, Fernando Castro
Valorização do pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) via
nanosuspensões para a aplicação em processos industriais / Fernando
Castro Leal. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Luciana Igarashi Mafra
Coorientador: Cristiane Vieira Helm

1. Compostos bioativos. 2. Reologia. 3. Cosméticos. I. Universidade
Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. III. Mafra, Luciana Igarashi. IV. Helm, Cristiane Vieira. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDO CASTRO LEAL** intitulada: **Valorização do pinhão (*Araucaria angustifolia (Bertol). Kuntze*) via nanosuspensões para a aplicação em processos industriais.**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA IGARASHI MAFRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica
01/03/2024 19:25:41.0
LUCIANA IGARASHI MAFRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
25/03/2024 16:08:56.0
ELAINE KASPCHAK
Avaliador Externo (INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS)

Assinatura Eletrônica
01/03/2024 17:22:54.0
EVANDRO BONA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
01/03/2024 14:22:23.0
BOGDAN DEMCZUK JUNIOR
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/03/2024 18:07:04.0
AGNES DE PAULA SCHEER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 341532
Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 341532

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e proteções concedidas durante toda a caminhada até aqui. Aos meus pais, Rita Maria de Oliveira Castro e Sirio Leal, todos meus irmãos, sobrinhos, tios e tias no geral, pelo apoio e por acreditar no meu potencial.

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora Professora Dr^a Luciana Igarashi Mafra e Co-orientadora Dra Cristiane Vieira Helm que demonstraram paciência, dedicação, profissionalismo e confiança tornando possível a elaboração deste estudo.

Aos professores Professor Dr. Marcos R. Mafra, Dr Rilton Alves de Freitas, Dr Washington Luiz Esteves Magalhães e Dr^a Fabiane Oliveira Farias pela ajuda, direta ou indiretamente no desenvolvimento da metodologia e da parte experimental.

Em especial, a Karina, minha parceira de vida que tornou toda esta trajetória mais leve, feliz e possível, estando sempre ao meu lado e sendo um grande suporte em todos os momentos. Por não medir esforços em me incentivar e auxiliar nas decisões a serem tomadas sobre a vida, bem como na elaboração, realização de experimentos, discussão e escrita de todos os trabalhos produzidos.

Aos meus amigos de Curitiba, Úrsula, Rafaela, Dani, Matheus, Tieli, Renan e Rogério que conviveram comigo durante todo este período. Onde passamos excelentes momentos, sem nunca perder a alegria.

Ao LATOS, Embrapa Florestas e ao BIOPOL por disponibilizar seus laboratórios, equipamentos e insumos para que grande parte deste estudo fosse realizado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) pela oportunidade e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro e à Universidade Federal do Paraná por tornar esta pesquisa possível.

Agradeço a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para que minha caminhada fosse possível. Muito obrigado.

RESUMO

O pinhão é a semente da araucária (pinheiro-do-paraná) e apresenta grande importância econômica e alimentícia para as regiões sul e sudeste do Brasil. Dentre as características nutricionais do pinhão, destaca-se o alto teor de amido na amêndoa e a presença de compostos bioativos em sua casca, os quais são responsáveis por proporcionar efeitos benéficos à saúde humana. O presente estudo teve como objetivo a valorização completa da semente do pinhão por meio da produção de nanosuspensões e suas aplicações no desenvolvimento de produtos. Foram obtidas nanosuspensões do pinhão integral (amêndoa + casca) (WPN), da amêndoa (APN) e casca do pinhão (PCN), com 6% de sólidos totais (m/m) utilizando moinho de pedras. As nanosuspensões foram avaliadas quanto sua composição, morfologia, propriedades térmicas e reológicas, atividade antioxidante e potencial citotóxico. A análise de composição nutricional demonstrou maior teor de fibras ($63,12 \pm 0,52$ %) e carboidratos ($74,39 \pm 0,23$ %) na PCN e na APN, respectivamente. A morfologia demonstrou que as amostras atingiram escala nanométrica. A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) exibiu o ponto de gelatinização da WPN e da APN próximo a 50 °C, devido a presença de amido e água nas amostras. Com relação a reologia, as amostras foram descritas como fluido pseudoplástico. As amostras PCN e APN apresentaram característica de gel fraco e a APN apresentou comportamento de líquido, e após o processo de aquecimento as amostras apresentaram propriedades mecânicas irreversíveis, devido ao processo de gelatinização e evaporação de água. A atividade antioxidante foi mensurada e correlacionada com os compostos identificados por GC-MS, onde identificou-se catequina, quercetina e ácido gálico majoritariamente em PCN e alto teor de açúcares em APN e WPN. Ainda, comprovou-se que as nanosuspensões não demonstraram citotoxicidade em células de fibroblastos de ratos (3T3). Com base nas características obtidas, a PCN foi incorporada nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2% (m/m) em uma formulação padrão de creme base, onde verificou-se completa homogeneização, sem alteração de odor ou estabilidade. Além disso, constatou-se que o aumento na concentração de PCN na formulação modificou a viscosidade e o comportamento mecânico das formulações, melhorando a espalhabilidade dos cremes. Além disso, verificou-se que a adição de PCN na formulação cosmética não apenas favoreceu a viabilidade celular em diferentes tipos de células avaliadas, mas também aumentou as propriedades curativas da formulação controle. A WPN foi utilizada na produção de máscaras faciais, onde observou-se elevada resistência mecânica na amostra com maior teor de nanosuspensão ($16,56 \pm 1,97$ MPa), e baixa umidade ($9,94 \pm 0,49$ %). Além disso, observou-se elevada solubilidade em água (valores acima de 35%) para todas as máscaras elaboradas. Verificou-se que a presença da WPN aumentou a atividade antioxidante das máscaras, as quais após 5 minutos imersas em água, liberaram os compostos bioativos no meio. Ainda, não foi verificada citotoxicidade das máscaras faciais em células 3T3 e em células de fibroblastos humanos (NHDF). Por meio da análise de biodegradabilidade, observou-se que as máscaras elaboradas foram totalmente decompostas em um período total de 56 dias. Por fim, o emprego direto das máscaras faciais em pele humana foi avaliado, sendo verificado melhora na adesividade após a imersão em água por 5 minutos, e consequente liberação de compostos bioativos, melhorando a eficácia da máscara facial.

Palavras-chave: Compostos bioativos, Reologia, Formulações cosméticas, Máscaras faciais.

ABSTRACT

The pinhão is the seed of the *Araucaria* (pinheiro do Paraná) and is of great economic and food importance for the southern and southeastern regions of Brazil. Among the nutritional characteristics of pine nuts, the high starch content in the almond and the presence of bioactive compounds in its shell stand out, which are responsible for providing beneficial effects on human health. The present study aimed at the complete valorization of pinhão seed through the production of nanosuspensions and their applications in product development. Nanosuspensions were obtained from the whole pinhão (almond + coat) (WPN), the almond (APN), and the pinhão coat (PCN), with 6% of total solids (w/w) using a stone mill. The nanosuspensions were characterized according to their composition, morphology, thermal and rheological properties, antioxidant activity, and cytotoxic potential. The nutritional composition analysis results showed a higher fiber content ($63.12 \pm 0.52\%$) and carbohydrate content ($74.39 \pm 0.23\%$) in PCN and APN, respectively. Morphology showed the potential of ultrafine grinding, reaching a nanometric scale. Differential scanning calorimetry (DSC) exhibited the gelatinization point of WPN and APN near $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ due to the presence of starch and water in both samples. Rheological data described the samples as pseudoplastic fluids. The mechanical behavior demonstrated that PCN and WPN exhibited weak gel characteristics, while APN behaved like a liquid, and after the heating process, nanosuspensions showed irreversible mechanical properties due to gelatinization process and water evaporation. Antioxidant activity of nanosuspensions was measured and correlated with compounds identified by chromatography (GC-MS), including catechin, quercetin, and gallic acid mainly in PCN, and high sugar content in APN and WPN. Nanosuspensions demonstrated no cytotoxicity in rat fibroblast cells (3T3). Based on the characteristics of the produced nanosuspensions, PCN was incorporated at concentrations of 0.5%, 1.0%, 1.5%, and 2% (w/w) as in a base cream formulation. Complete homogenization was achieved without alterations in odor or formulations stability. The boost of PCN concentration modified viscosity and mechanical behavior of formulations, improving the spreadability, and conferring high cell viability and healing properties to the formulations. WPN was employed in the production of facial masks, which conferred high mechanical resistance in the masks ($16.56 \pm 1.97\text{ MPa}$) and low moisture ($9.94 \pm 0.49\%$). All masks showed high water solubility (values above 35%). WPN presence conferred antioxidant activity to the masks, releasing bioactive compounds into the water after 5 minutes. No cytotoxicity was observed in 3T3 and human dermal fibroblast cells (NHDF) for all evaluated concentrations. Biodegradability analysis revealed complete decomposition of the masks in 56 days. The facial masks on human skin improved adhesiveness after a 5-minute water immersion, facilitating the release of bioactive compounds and enhancing mask effectiveness.

Keywords: Pinhão, Bioactive compounds, Nanosuspensions, Rheology, Industrial applications.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol). Kuntze)	19
FIGURA 2. PINHÕES E SEUS CONSTITUINTES A PARTIR DAS PINHAS DA <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol). Kuntze).	21
FIGURA 3. ESTRUTURA DOS FITOESTERÓIS MAIS ENCONTRADOS EM ALIMENTOS.....	25
FIGURA 4. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	29
FIGURA 5: MOINHO DE PEDRAS UTILIZADO PARA SÍNTESE DE NANOSUSPENSÕES.	32
FIGURA 6. NANOSUSPENSÃO DE CELULOSE BRANQUEADA DE PINUS OBTIDA A PARTIR DO MOINHO DE PEDRAS.	32
FIGURA 7. FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.	39
FIGURA 8: SÍNTESE DAS NANOSUSPENSÕES A PARTIR DO PINHÃO.....	40
FIGURA 9: NANOSUSPENSÕES OBTIDAS PARA CARACTERIZAÇÃO.	54
FIGURA 10 MORFOLOGIA DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO APÓS SÍNTESE EM MOINHO DE PEDRAS: PCN (A), WPN (B) E APN (C). AS IMAGENS FORAM OBTIDAS EM TRÊS AUMENTOS 500× (A), 500× (B), 2000× (C), 75000× (D*).....	57
FIGURA 11: PROPRIEDADES TÉRMICAS DE NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO AVALIADAS PELAS CURVAS (TGA) E DTG NA TAXA DE 10°C/min UTILIZANDO RAMPA DE TEMPERATURA DE 25 A 500 °C EM FLUXO DE NITROGÊNIO (50 mL/min).	59
FIGURA 12: PERFIL DE VISCOSIDADE DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO A 25 °C.	62
FIGURA 13: PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO ATRAVÉS DO MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (G'- SÍMBOLOS ABERTOS) E MÓDULO DE PERDA (G''- SÍMBOLOS SÓLIDOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA A 25 °C. A FREQUÊNCIA FOI FIXADA NA FAIXA DE 0,01 Hz A 10 Hz COM UMA TENSÃO DE CISALHAMENTO DE 1 Pa.....	64

FIGURA 14: PROPRIEDADES TERMOMECÂNICAS DE NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO ATRAVÉS DO MÓDULO ELÁSTICO (G'- SÍMBOLOS ABERTOS) E MÓDULO VISCOSO (G''- SÍMBOLOS SÓLIDOS) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. A FREQUÊNCIA FOI FIXADA EM 10 HZ COM UMA TENSÃO DE CISALHAMENTO DE 1 Pa, EMPREGANDO TAXA DE AQUECIMENTO DE 5 °C/MIN.....	66
FIGURA 15: PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO (A- PCN, B-WPN E C-APN) ATRAVÉS DO MÓDULO ELÁSTICO (G'- SÍMBOLOS ABERTOS) E MÓDULO VISCOSO (G''- SÍMBOLOS SÓLIDOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANTES DO PROCESSO DE AQUECIMENTO E APÓS VARREDURA DE OSCILAÇÃO DE TEMPERATURA (OT). A TENSÃO DE CISALHAMENTO DE 1 Pa, E VARIAÇÃO DE FREQUÊNCIA FIXADA NA FAIXA ENTRE 0,01 Hz A 10 Hz.	67
FIGURA 16. AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS NANOSUSPENSÕES.	75
FIGURA 17: VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGOS APÓS EXPOSIÇÃO NAS NANOSUSPENSÕES PROVENIENTES DO PINHÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	77
FIGURA 18: ASPECTO VISUAL DAS FORMULAÇÕES OBTIDAS APÓS A ADIÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO COM A FORMULAÇÃO CONTROLE...	79
FIGURA 19: PERFIL DE VISCOSIDADE APARENTE (Pa.s) DA PCN, LOÇÃO CONTROLE E FORMULAÇÕES OBTIDAS EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO (s ⁻¹) A 25 °C.	82
FIGURA 20: VARREDURA DE FREQUÊNCIA ATRAVÉS DO MÓDULO ELÁSTICO (G'- SÍMBOLOS SÓLIDOS) E DO MÓDULO VISCOSO (G''- SÍMBOLOS ABERTOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (HZ), À TEMPERATURA DE 25 °C DE PCN, DA LOÇÃO DE CONTROLE E DAS FORMULAÇÕES ELABORADAS À BASE DE PCN.	83
FIGURA 21: ESTABILIDADE TÉRMICA DA LOÇÃO CONTROLE E DAS FORMULAÇÕES À BASE DE PCN EM FUNÇÃO DO TAN δ E DO TEMPO (MINUTOS). A FREQUÊNCIA PERMANECEU EM 10 HZ E A TENSÃO DE CISALHAMENTO EM 1 PA.	84

FIGURA 22:VIABILIDADE CELULAR DA LOÇÃO DE CONTROLE E FORMULAÇÕES BASEADAS EM PCN EM CÉLULAS DE CAMUNDONGOS DE FIBROBLASTOS NIH 3T3 (A) E CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS (NHDF) (B) E CÉLULAS DE CULTURA CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT) (C).	86
FIGURA 23: TESTE DE ARRANHÃO EM CÉLULAS HaCaT DAS FORMULAÇÕES À BASE DE PCN E FORMULAÇÃO CONTROLE AVALIADAS EM CONCENTRAÇÕES DE 0,02 E 0,125 mg/mL POR 24 HORAS, 48 HORAS E 72 HORAS.	88
FIGURA 24: CAPACIDADE DE FECHAMENTO DO ARRANHÃO CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO APÓS 24H, 48H E 72H DE ANÁLISE.	89
FIGURA 25: MÁSCARAS FACIAIS OBTIDAS A PARTIR DO PINHÃO.....	91
FIGURA 26:MORFOLOGIA DAS MÁSCARAS OBTIDAS A PARTIR DO PINHÃO, SOB DOIS AUMENTOS, SENDO VISTA SUPERFICIAL (200X) E SEÇÃO TRANSVERSAL (400X)	92
FIGURA 27:LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DAS MÁSCARAS FACIAIS DE PINHÃO A PARTIR DAS METODOLOGIAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (A) E CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH (B).	96
FIGURA 28: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS MÁSCARAS FACIAIS OBTIDAS A PARTIR DO PINHÃO EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE RATOS (NIH-3T3) (A) E FIBROBLASTOS HUMANOS (NHDF) (B).	98
FIGURA 29:AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DAS MASCARAS FACIAIS ELABORADAS A PARTIR DO PINHÃO.	99
FIGURA 30:FRAÇÕES DAS MÁSCARAS FACIAIS AVALIADAS ANTES E APÓS A IMERSÃO EM ÁGUA.	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FORMULAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA ADIÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO.....	47
TABELA 2: MÁSCARAS FACIAIS SINTETIZADAS A PARTIR DO PINHÃO.....	50
TABELA 3: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO DAS AMOSTRAS SECAS.....	55
TABELA 4: TRANSIÇÃO TÉRMICA NA NANOSUSPENSÃO PROVENIENTE DO PINHÃO E SEUS CONSTITUINTES.....	60
TABELA 5: COMPOSTOS HIDROFÍLICOS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO..	69
TABELA 6: COMPOSTOS LIPOFÍLICOS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO.	72
TABELA 7: AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES NOS PARÂMETROS DE pH, ESPALHABILIDADE E COR.	80
TABELA 8: COR E ESPESSURA DAS MÁSCARAS FACIAIS ELABORADAS A PARTIR DO PINHÃO.	93
TABELA 9: HIDROFILICIDADE (UMIDADE E SOLUBILIDADE) DOS FILMES SINTETIZADOS DO PINHÃO.	94
TABELA 10: PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO) DAS MÁSCARAS FACIAIS ELABORADAS A PARTIR DO PINHÃO.	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. ASPECTOS GERAIS DA <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol). Kuntze)	19
3.1.1. Pinhão e seus constituintes	20
3.2. COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO PINHÃO	23
3.3. BIOMASSA: DEFINIÇÕES E FUNDAMENTOS	29
3.3.1. Uso do moinho de pedras para a produção de nanosuspensões.....	30
3.3.2. Aplicações das nanosuspensões	33
3.4. APLICAÇÕES DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO E SEUS CONSTITUINTES	34
3.4.1. Formulações cosméticas	35
3.4.2. Máscaras faciais.....	36
3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DAS NANOSUSPENSÕES	39
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOSUSPENSÕES	40
4.2.1. Avaliação morfológica das nanosuspensões.....	41
4.2.2. Análise térmica das nanosuspensões	41
4.2.3. Avaliação do comportamento reológico das nanosuspensões	42
4.2.4. Perfil cromatográfico das nanosuspensões via CG-MS	43
4.2.5. Determinação da atividade antioxidante das nanosuspensões	44
4.2.6. Avaliação da citotoxicidade das nanosuspensões em células 3T3	45
4.3. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO	46
4.3.1. Avaliação da cor das formulações	47
4.3.2. Avaliação da estabilidade primária das formulações.....	47

4.3.3. Avaliação da espalhabilidade das formulações	48
4.3.4. Avaliação das propriedades reológicas das formulações obtidas	48
4.3.5. Avaliação da citotoxicidade das formulações	49
4.3.6. Avaliação do potencial curativo das formulações	49
4.4. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DO PINHÃO INTEGRAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÁSCARAS FACIAIS.....	50
4.4.1. Síntese das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão.....	50
4.4.2. Avaliação da umidade e solubilidade das máscaras faciais	51
4.4.3. Avaliação das propriedades mecânicas das máscaras faciais	51
4.4.4. Liberação dos compostos bioativos <i>in vitro</i>	52
4.4.5. Avaliação da citotoxicidade das máscaras faciais	52
4.4.6. Avaliação da biodegradabilidade das máscaras faciais	53
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOSUSPENSÕES PROVENIENTES DO PINHÃO E SEUS CONSTITUINTES	54
5.1.1. Composição nutricional	55
5.1.2. Morfologia das nanosuspensões	57
5.1.3. Perfil térmico das nanosuspensões.....	58
5.1.4. Comportamento reológico das nanosuspensões.....	62
5.1.4.1. Perfil de viscosidade	62
5.1.4.2. Propriedades mecânicas das nanosuspensões	64
5.1.4.3. Propriedades termomecânicas das nanosuspensões	65
5.1.5. Perfil cromatográfico das nanosuspensões obtido via CG-MS.....	68
5.1.6. Avaliação da atividade antioxidante das nanosuspensões.....	74
5.1.7. Avaliação do potencial citotóxico das nanosuspensões em células 3T3.....	77
5.2. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO COMO ADITIVOS EM CREMES FACIAIS.....	79
5.2.1. Obtenção das amostras	79

5.2.2. Caracterização das formulações obtidas a partir da adição da nanosuspensão da casca do pinhão	80
5.2.3. Avaliação das propriedades reológicas das formulações	81
5.2.4. Avaliação da citotoxicidade das formulações	85
5.2.5. Avaliação da capacidade curativa <i>in vitro</i> das formulações	87
5.3. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DO PINHÃO INTEGRAL PARA A PRODUÇÃO DE MASCARAS FACIAIS.....	91
5.3.1. Obtenção e avaliação da estrutura das máscaras faciais produzidas a partir da nanosuspensão do pinhão integral.....	91
5.3.2. Caracterização das máscaras faciais obtidas a partir pinhão.....	93
5.3.3. Avaliação da umidade e solubilidade das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão	94
5.3.4. Liberação de compostos antioxidantes (<i>in vitro</i>) das máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão.	95
5.3.5. Citotoxicidade das máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão	97
5.3.6. Avaliação da biodegradabilidade das máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão	99
5.3.7. Aplicação das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão	100
6. CONCLUSÕES	104
6.1. Produção científica decorrente do período de doutorado (março de 2020 – fevereiro de 2024). 106	
REFERÊNCIAS	107

1. INTRODUÇÃO

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) é uma conífera presente principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil. Nas últimas décadas houve uma exploração desordenada desta espécie para a comercialização da madeira, relacionada principalmente com a fabricação de móveis e ao seu uso na construção civil. Em consequência dessa exploração, essa árvore esteve presente na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, sendo proibido seu corte e o beneficiamento da madeira. Uma das alternativas encontradas para a exploração sustentável da araucária e sua consequente valorização, é o uso de sua semente, denominada pinhão (BRANCO; RODRIGUES, 2016).

O pinhão é o principal produto da araucária, e corresponde a uma importante fonte de renda para a população rural. Além disso, a semente também é uma fonte rica em biocompostos, tais como flavonoides, compostos fenólicos e fitoesteróis, os quais apresentam propriedades benéficas à saúde humana, tais como ação antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana. Os fitoesteróis são derivados de triterpenos e apresentam grande importância de extração e aplicação na indústria de alimentos. No organismo humano esses compostos atuam na redução dos níveis de colesterol no sangue e na prevenção de doenças cardiovasculares. Os compostos antioxidantes são encontrados em ambas as frações do pinhão, estando dispostos majoritariamente na casca, e em menores concentrações na amêndoa do pinhão (KOEHNLEIN *et al.*, 2012; PERALTA *et al.*, 2016).

A amêndoa (parte comestível do pinhão), é rica em amido, responsável por conferir ao produto alto valor energético. Ainda, apresenta baixo índice glicêmico, baixos teores de lipídios e carboidratos simples e ausência de glúten. Devido às características citadas, a amêndoa do pinhão pode ser empregada no desenvolvimento de produtos sem glúten, bem como na elaboração de filmes biodegradáveis (BRANCO; RODRIGUES, 2016).

Com relação a casca do pinhão, trata-se do resíduo da semente subutilizado, que leva anos para a sua total decomposição. No entanto, esse subproduto é de grande

relevância por apresentar diversas características benéficas à saúde humana, tais como alto teor de fibras alimentares, minerais e compostos bioativos. Outra característica que pode ser aproveitada da casca do pinhão é a presença do complexo lignocelulósico, formado majoritariamente por três constituintes principais: a hemicelulose, celulose e a lignina. Esses polímeros são de complexa obtenção devido à estrutura recalcitrante do material lignocelulósico. Nesse sentido, os processos industriais comumente utilizados para o beneficiamento do complexo lignocelulósico, demandam alto gasto energético, além de serem responsáveis pela geração de grandes quantidades de resíduos. No entanto, nos últimos anos com a crescente preocupação ambiental, novas alternativas têm sido estudadas, a fim de reduzir a geração de danos ao ecossistema. Desse modo, vale destacar o emprego de métodos físicos no beneficiamento da biomassa, utilizando baixas temperaturas durante o processo e menor consumo energético.

Dentre os métodos físicos de menor impacto para o ambiente, destaca-se o moinho de pedras, o qual utiliza água e baixa temperatura de processo, possibilitando a síntese de uma nanosuspensão rica em compostos bioativos de alto valor agregado, sem a geração de resíduos. A nanosuspensão resultante exibe características próprias, e potencial de aplicação em diversas áreas industriais, tais como materiais, cosméticos, alimentos e fármacos. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo a valorização do pinhão e seus constituintes por meio da produção, caracterização e aplicação de nanosuspensões a partir do moinho de pedras.

Primeiramente, as nanosuspensões foram obtidas de diferentes partes do pinhão, sendo elas a casca (PCN), amêndoa (APN) e o pinhão em sua forma integral (WPN), as quais foram caracterizadas de acordo com sua composição, morfologia, comportamento reológico e citotoxicidade, sendo os resultados descritos nos itens 5.1 e 5.2 deste trabalho. A partir dos resultados obtidos foram realizadas diferentes aplicações para a nanosuspensão elaborada a partir da casca do pinhão e de sua forma integral.

Sequencialmente, avaliou-se o emprego da nanosuspensão da casca do pinhão em formulações cosméticas (item 5.3) a fim de verificar o potencial da PCN em melhorar as propriedades reológicas da formulação controle, bem como avaliar sua espalhabilidade na pele humana. Além disso, avaliou-se a viabilidade celular e potencial

de cicatrização das formulações elaboradas a partir da nanosuspensão da casca do pinhão e a formulação controle.

Ainda, é importante ressaltar o potencial da nanosuspensão a partir do pinhão integral como aditivo na elaboração de máscaras faciais, situado na seção 5.4 deste trabalho. Assim, avaliaram-se as propriedades mecânicas, solubilidade, e umidade das máscaras produzidas. Além disso, verificou-se a liberação de compostos bioativos das máscaras faciais a partir do pinhão, os quais apresentam propriedades benéficas para a pele humana devido a atividade antioxidante. Por fim, avaliou-se a biodegradabilidade das máscaras faciais elaboradas, bem como um modo de preparo para aplicação da máscara facial, a fim de melhorar a efetividade da máscara facial, bem como suas propriedades de conformação a pele humana.

De modo geral, a produção, caracterização e aplicação das nanosuspensões a partir do pinhão e seus constituintes aumentou a gama de potenciais aplicações desta semente em produtos já comercializados. O desenvolvimento de produtos utilizando o pinhão como aditivo é uma alternativa para a valorização e conservação da araucária, além de um estímulo para os produtores de pinhão, em manter sua coleta, conservação e comercialização.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Valorizar o pinhão de forma sustentável a partir da produção, caracterização e aplicação de nanosuspensões no desenvolvimento de novos produtos contendo pinhão em sua composição.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as nanosuspensões a partir do pinhão e seus constituintes utilizando o moinho de pedras;
- Caracterizar as nanosuspensões por meio das análises físico-químicas, morfológicas, térmicas, antioxidantes e citotóxicas;
- Aplicar e avaliar as formulações cosméticas adicionadas da nanosuspensão da casca do pinhão, quanto suas características físicas, reológicas; citotóxicas e curativas;
- Produzir e caracterizar máscaras faciais a partir da nanosuspensão do pinhão integral, avaliando suas características morfológicas, propriedades mecânicas, hidrofiliabilidade, citotoxicidade e biodegradabilidade além de desenvolver um método de uso do produto final.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção serão avaliados os seguintes tópicos: aspectos gerais da *Araucaria angustifolia* (Bertol. Kuntze), pinhão e seus constituintes, e compostos bioativos presentes no pinhão. Em seguida, serão abordadas algumas propriedades referentes à casca do pinhão: biomassa (definições e fundamentos) e o uso de pré-tratamentos, com enfoque para o uso do moinho de pedras e emprego das suspensões de nanofibrilas. Por fim, serão abordadas aplicações para as nanosuspensões provenientes do pinhão e seus constituintes.

3.1. ASPECTOS GERAIS DA *Araucaria angustifolia* (Bertol. Kuntze)

A *Araucaria angustifolia* (Bertol. Kuntze), popularmente conhecida como Pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro ou somente Araucária (FIGURA 1), é uma conífera pertencente à família *Araucariaceae*, nativa da América do Sul. A Araucária é encontrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, ultrapassando 200 anos de vida e até 50 metros de altura, sendo a única gimnosperma nativa da Mata Atlântica (PERALTA *et al.*, 2016).

FIGURA 1. *Araucaria angustifolia* (Bertol. Kuntze)



FONTE: O autor (2024).

Durante várias décadas, a madeira da Araucária foi intensamente explorada e considerada a principal madeira de exportação do Brasil, fato que quase culminou para o desaparecimento da espécie, restando apenas de 30% da população original. Atualmente, essa espécie representa grande importância para o reflorestamento e a conservação da mata atlântica (KOEHNLEIN *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014).

A *Araucaria angustifolia* (Bertol). Kuntze) é uma das principais fontes de renda de famílias e agricultores do sul do Brasil, principalmente pelos seus produtos, como as suas sementes, conhecida como pinhão, a qual também é fonte de alimento para a população e para diversas espécies de animais. Essas sementes, caracterizam-se por ser um produto sazonal, coletado entre os meses de abril a agosto, sendo encontrado no interior dos estróbilos femininos presentes nas árvores, denominados cones, que resultam na formação das pinhas (BRANCO; RODRIGUES, 2016). Anualmente, uma *Araucária angustifolia* produz em média 40 pinhas, de dimensões que variam entre 10 e 25 centímetros, produzindo em média 5 a 150 pinhões, os quais apresentam peso entre 7 e 9 gramas cada (SANTOS *et al.*, 2018).

3.1.1. Pinhão e seus constituintes

A produção anual do pinhão no Brasil equivale à 12.481 toneladas ao ano, sendo o estado do Paraná responsável pela produção de aproximadamente 3.600 toneladas ao ano (IBGE, 2021). A produtividade do pinhão aumentou significativamente desde os anos 90 devido às políticas de reflorestamento e manutenção da espécie, juntamente com novas técnicas de manejo e exploração dessa semente. O comércio do pinhão é predominantemente realizado *in natura*, devido a sua sazonalidade de produção, não sendo feitos grandes investimentos para a conservação dessas sementes. Geralmente, o pinhão é consumido após o processo de cocção, mas também é utilizado em forma de farinha, para a produção de pratos regionais, pães e assados (CORDENUNSI *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2018).

O pinhão é constituído por sua amêndoa e casca (FIGURA 2), os quais apresentam diversas propriedades benéficas à saúde humana, devido as suas

propriedades funcionais. O amido (40%) corresponde ao componente majoritário presente na amêndoa do pinhão. No entanto, também são encontrados na semente, proteínas (3%), açúcares solúveis (2%), lipídeos (1%), fibras alimentares (36%), minerais (0,2%) e carboidratos (17,8%) (BRANCO; RODRIGUES, 2016; KOEHNLEIN *et al.*, 2012).

FIGURA 2. PINHÕES E SEUS CONSTITUINTES A PARTIR DAS PINHAS DA *Araucaria angustifolia* (Bertol). Kuntze).



FONTE: O autor (2024).

A amêndoa do pinhão corresponde à maior quantidade mássica da semente, representando cerca de 70% em massa. Normalmente, a amêndoa do pinhão é consumida após processo de cocção, devido seu aspecto rígido. Além disso, o processo de cocção gelifica a fração amilácea, aumentando o teor de umidade em comparação com a matriz *in natura*. Outra propriedade do processo de cocção está relacionada ao teor de compostos fenólicos presentes na matriz, uma vez que ocorre a migração, em parte, desses compostos provenientes da casca interna e externa da semente para a amêndoa (FERREIRA *et al.*, 2021).

Dentre os benefícios da amêndoa, destaca-se o alto valor nutricional, devido a presença de amido, fibras alimentares, proteínas e minerais. O amido exibe como um de seus principais constituintes a amilose, sendo encontrada na amêndoa do pinhão. Após o processo de cocção da amilose, observa-se a formação do amido resistente, que é absorvido lentamente pelo organismo. Esta propriedade é responsável por conferir ao alimento baixo índice glicêmico (CORDENUNSI *et al.*, 2004; PERALTA *et al.*, 2016). O

consumo de alimentos de baixo índice glicêmico apresenta grandes benefícios à saúde humana, tais como a prevenção e tratamento de doenças como obesidade e diabetes (SANTOS *et al.*, 2018).

Com relação aos compostos encontrados na amêndoa do pinhão, é importante ressaltar a presença de ácidos graxos, como o ácido linoleico (18: 2n-6), ácido oleico (18: 1n-9) e ácido palmítico (16:0). Além dos ácidos graxos, estão presentes os esteróis, tais como o α e o β - tocoferol e β -sitosterol (SILVA *et al.*, 2016) e os compostos fenólicos, como a catequina, ácido gálico e a quercetina (KOEHNLEIN *et al.*, 2012; PERALTA *et al.*, 2016). A amêndoa do pinhão também é fonte de nutrientes inorgânicos, como o potássio, fósforo, manganês, cobre, molibdênio e cromo (FERREIRA *et al.*, 2021).

Sobre o potencial de aplicação da amêndoa do pinhão, destaca-se o emprego do amido proveniente da amêndoa como excipiente farmacêutico, uma vez que os grânulos de amido do pinhão apresentam pH mais neutro, baixo teor de umidade, e temperatura de gelatinização inferior em comparação ao amido de milho (DAUDT *et al.*, 2014).

Em outro trabalho, Daudt e colaboradores (2015) avaliaram o potencial do amido proveniente do pinhão para o emprego em formulações cosméticas, sendo obtido um gel. As formulações foram caracterizadas avaliando a resistência à centrifugação, pH, espalhabilidade, reologia e atividade antioxidante. A análise sensorial foi realizada para verificar a aceitabilidade dos ingredientes para os consumidores potenciais. Os autores observaram que as formulações apresentaram estabilidade por resistência à centrifugação e não houve qualquer irritação da pele ou alteração do pH cutâneo. Ainda, a adição de amido do pinhão melhorou a espalhabilidade e aumentou a viscosidade quando comparada às formulações controle. De tal forma, o amido do pinhão demonstrou resultados promissores como potencial aditivo natural em formulações cosméticas.

Com relação a casca do pinhão, corresponde a cerca de 30% da massa total do pinhão em base úmida, sendo considerada o principal resíduo da semente, uma vez que, é descartada no meio ambiente e apresenta difícil decomposição. No entanto, a casca do pinhão exhibe características pouco exploradas, como a presença do complexo lignocelulósico, composto por celulose, hemicelulose e lignina. Essas macromoléculas

são amplamente utilizadas como biomassa para desenvolvimento de produtos, na área de polímeros, biocombustíveis e nanomateriais (LIMA *et al.*, 2020; TIMM *et al.*, 2020).

A casca do pinhão também possui propriedades nutricionais, como alto teor de biocompostos, tais como os compostos fenólicos, como taninos, catequina, quercetina, ácido gálico, ácido ferúlico. Estes bioativos são responsáveis por promover benefícios à saúde interligadas a atividade antioxidante, antidiabética, anticancerígena e de inibidor enzimático (BRANCO; RODRIGUES, 2016; PERALTA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2014). Outros compostos, encontrados na casca do pinhão são os esteróis, como o β sitoesterol e campesterol, os quais apresentam capacidade de reduzir o colesterol e conseqüentemente, atuam na prevenção de doenças cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2020). Devido à presença de biocompostos na casca do pinhão, torna-se necessário o emprego de alternativas para o aproveitamento desses resíduos, evitando o seu descarte e maximizando o aproveitamento dos compostos bioativos (FREITAS *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

Diante do exposto, verificou-se que o pinhão e os seus constituintes exibem em sua composição biomoléculas de alto valor agregado, responsáveis por desempenhar atividades benéficas à saúde. No entanto, além das propriedades biológicas interligadas às biomoléculas, observa-se a presença do complexo lignocelulósico na casca do pinhão, que pode ser aplicado para a elaboração de nanomateriais. Portanto, nos tópicos seguintes serão abordados fundamentos e os mecanismos antioxidantes dos biocompostos juntamente com seus benefícios conferidos à saúde humana. Em seguida, serão expostos conceitos referentes a biomassa e ao emprego da casca do pinhão para a síntese de nanoestruturas.

3.2. COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO PINHÃO

Os compostos bioativos estão presentes em diversas matrizes vegetais, como plantas, frutas e legumes, apresentando função de suprir parte das necessidades nutricionais do corpo humano (ALI *et al.*, 2019). Sua composição química está

relacionada com a presença de peptídeos, vitaminas, ácidos graxos, flavonoides e fitoesteróis. Alguns dos compostos citados são conhecidos por exibir atividade antioxidante, uma propriedade responsável por fornecer ao organismo humano inúmeros benefícios à saúde (MENG *et al.*, 2018).

Dentre os principais problemas relacionados à conservação e vida útil de produtos alimentícios, pode-se destacar os processos de oxidação ocasionados principalmente pela presença de radicais livres, tais como radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$), radicais alcoxila ($\text{RO}\cdot$), dentre outros (HALLIWELL *et al.*, 1997). A alta presença dos radicais livres é responsável pela formação de compostos altamente reativos, causando interferências na bioquímica celular (URSO; CLARKSON, 2003).

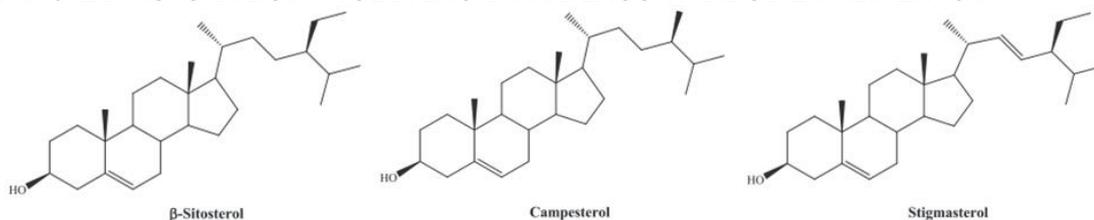
Para a saúde humana, a alta quantidade de radicais livres é responsável por gerar um desequilíbrio no organismo causando estresse oxidativo. Dessa forma, os compostos antioxidantes são responsáveis por atuar como sequestradores de radicais livres, gerando diversos benefícios ao corpo humano (HALLIWELL *et al.*, 1997; URSO; CLARKSON, 2003). Os produtos industrializados geralmente são enriquecidos com antioxidantes sintéticos, a fim de prolongar a vida útil e gerar benefícios à saúde humana. No entanto, existem inúmeros compostos bioativos naturais provenientes de matrizes vegetais, tais como os compostos fenólicos, flavonoides e tocoferóis, de interesse da indústria química, farmacêutica e de alimentos, agregando valor ao produto final (SOUZA *et al.*, 2014).

O pinhão e seus constituintes apresentam em sua constituição diferentes classes de biocompostos, tais como fitoesteróis, compostos fenólicos e flavonoides. Dentre os compostos bioativos presentes é importante ressaltar a presença dos fitoesteróis, os quais são encontrados em grandes quantidades na amêndoa e na casca do pinhão (LIMA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2016).

Os fitoesteróis são compostos naturais pertencentes à família dos triterpenos, são encontrados em vegetais, legumes, frutas e principalmente em sementes, cereais e nozes. Esses compostos estão presentes tanto na forma livre, quanto esterificados com ácidos graxos ou conjugados com glicosídeos, e são encontrados em alimentos na forma

de β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (FIGURA 3) (GARCIA-LLATAS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2016).

FIGURA 3. ESTRUTURA DOS FITOESTERÓIS MAIS ENCONTRADOS EM ALIMENTOS.



FONTE: Adaptado de GARCIA-LLATAS *et al.*; 2021.

Os fitoesteróis e seus ésteres de ácidos graxos são compostos estáveis, e pouco susceptíveis a degradação. No entanto, quando submetidos a processos envolvendo alta temperatura e presença de oxigênio, ocorre a oxidação do fitosterol. Nos processos industriais os fitoesteróis são utilizados para a proteção de óleos, atuando como agente antioxidante durante o processamento e exposição à luz (BAI *et al.*, 2021; GARCIA-LLATAS *et al.*, 2021). No organismo humano, os fitoesteróis e seus isômeros são precursores de diversos benefícios à saúde humana, como ação antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, anti-inflamatória, antidiabética e também atuam na diminuição dos níveis de colesterol no sangue e prevenção de doenças cardiovasculares (BAI *et al.*, 2021; GHAEDI *et al.*, 2020).

Com relação a extração e quantificação de fitoesteróis presentes no pinhão e seus constituintes, Silva e colaboradores (2016), avaliaram a extração de tocoferóis e óleos presentes na amêndoa do pinhão empregando extração subcrítica com n-propano e extração utilizando o método de soxhlet, utilizando solventes orgânicos. Como resultado, os autores observaram que o emprego do n-propano subcrítico proporcionou um rendimento de extração semelhante ao método de soxhlet. Em termos de extração, os autores observaram que o emprego do n-propano subcrítico a 40 °C e 8 MPa proporcionou maior concentração de ácidos graxos, tais como as séries ômega-6 e ômega-3, tocoferol total e fitosterol total. Outra observação dos autores foi que o aquecimento durante a extração por soxhlet contribuiu para a degradação parcial de alguns compostos.

De Lima e colaboradores (2020), avaliaram o teor de biocompostos presentes em suspensões provenientes da casca do pinhão seca e da casca do pinhão pós processo de branqueamento. Foi avaliado o perfil de compostos presentes nas suspensões utilizando GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography coupled with mass spectrometry*). Os autores avaliaram as frações de ambas as amostras branqueadas e não branqueadas. Como resultado, foi possível observar que o processo de branqueamento degradou, em sua maioria, os compostos bioativos presentes. Na fração lipofílica da análise cromatográfica para a suspensão da casca não branqueada, foram encontrados alto teor de β -sitosterol e campesterol.

Os compostos fenólicos e flavonoides são estruturas que apresentam um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas em sua estrutura. Esses biocompostos são amplamente encontrados em matrizes vegetais, podendo ser específicos de um determinado local da planta ou época de desenvolvimento (ALARA *et al.*, 2021). Em alimentos, os fenóis e flavonoides são responsáveis por conferir diversas alterações benéficas no processamento, tais como adstringência, cor, aroma e principalmente, atividade antioxidante. Dentre as principais funções biológicas desses compostos no organismo humano, é importante ressaltar a ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticancerígena (MIKOŁAJCZAK *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2018).

Devido aos inúmeros benefícios biológicos proporcionados pelos compostos fenólicos e flavonoides, diversos trabalhos na literatura exploram seu potencial de extração, quantificação e manutenção. O pinhão e seus constituintes possuem grandes quantidades desses compostos em sua composição, sendo o ácido gálico, catequina e a quercetina os majoritários (BRANCO; RODRIGUES, 2016; MIKOŁAJCZAK *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2018).

Com relação ao emprego do pinhão e seus constituintes como potencial para extração, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos e flavonoides, são relatados trabalhos relacionados a amêndoa e a casca. Cordenunsi e colaboradores (2004), relataram em seus estudos o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes na amêndoa do pinhão *in natura* e pós cozimento, avaliando a presença da casca interna e

externa do pinhão. Os autores observaram que a amêndoa *in natura* mostrou baixo teor de biocompostos. No entanto, após o processo de cocção, os compostos fenólicos migram da casca para a amêndoa, aumentando sua atividade antioxidante. Com relação ao teor de flavonoides não foi identificada a presença de nenhum flavonoide na amêndoa do pinhão cru. No entanto, foi quantificada a quercetina presente em quantidades significativas na película interna do pinhão. Por fim, os autores observaram que o cozimento favoreceu a migração da quercetina para a amêndoa, mas não para a água de cozimento, diferentemente da catequina, que migrou para a água de cozimento e para a amêndoa.

Koehnlein e colaboradores (2012), verificaram o potencial antioxidante do pinhão após a etapa de cozimento, avaliando a amêndoa seca antes e após o processo de cocção. Com relação ao teor de compostos fenólicos totais, os autores observaram que, semelhante ao estudo de Sant'Anna e colaboradores (2016), o processo de cocção do pinhão aumentou os compostos fenólicos presentes na amêndoa, devido a migração desses compostos durante o cozimento. Dentre os bioativos quantificados pelos autores, em ambas as condições foi possível observar a presença majoritária de catequina, mas também foi possível identificar ácido gálico e quercetina em menor quantidade em ambas as condições empregadas.

Sant'Anna e colaboradores (2016), realizaram a quantificação de biocompostos presentes na casca do pinhão sem cocção e na casca do pinhão submetida ao processo de cocção em diferentes tempos de estocagem. Foi possível observar que o conteúdo de polifenóis aumentou no resíduo submetido ao cozimento. A capacidade de redução do radical DPPH, diminuiu de 93% para 88% após o tratamento térmico, e por último, não houve alteração na redução do radical ABTS. Outra análise realizada pelos autores foi a capacidade quelante do íon ferro, o qual não apresentou atividade para a casca do pinhão. Os autores não identificaram degradação de compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante durante as condições de armazenamento.

De Freitas e colaboradores (2018), estudaram o potencial antioxidante dos extratos alcoólicos, hidroalcoólicos e a água de cozimento provenientes da casca do pinhão para aplicação em filmes. Para caracterização dos bioativos presentes nos

extratos, foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro*, empregando as metodologias de DPPH, FRAP e ABTS. Os resultados referentes à análise de DPPH não apresentaram diferença significativa para nenhum dos extratos. Em relação à análise de FRAP, foi possível observar uma maior atividade antioxidante para o extrato hidroalcolico. Em relação aos resultados da análise ABTS, a água de cozimento do pinhão apresentou maior atividade antioxidante em comparação ao extrato hidroalcolico e extrato alcoólico. Os mesmos autores realizaram a quantificação empregando HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) dos extratos obtidos. A partir dessa análise foi possível identificar maiores quantidades de catequina e de dímero (epi)-catequina em maior quantidade no extrato hidroalcolico. Para os extratos provenientes da água de cozimento e etanol a maior quantificação encontrada foi de ácido protocatecuico.

Como parte final do trabalho os extratos obtidos foram aplicados em filmes a base de zeína (proteína do milho), os quais apresentaram melhor resultado para os extratos provenientes da água de cocção. Dentre as propriedades conferidas ao filme, pode-se destacar o aumento de resistência a tração e intervalo de alongamento, juntamente com o efeito plastificante. Os extratos hidroalcolicos e etanoicos, quando incorporados, produziram filmes mais fragilizados (FREITAS *et al.*, 2018).

Santos e colaboradores (2018), avaliaram o processo de extração e quantificação dos biocompostos da casca do pinhão empregando como solvente a mistura etanol:água e como método de extração, o ultraturrax. Os autores identificaram treze compostos diferentes presentes na casca do pinhão, sendo os principais: catequina e epi-catequina, ácido ferrúlico e ácido protocatecuico. Os autores concluíram que para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos, pode ser utilizada uma temperatura mais baixa, no entanto é necessária maior proporção de etanol na mistura de solventes utilizada.

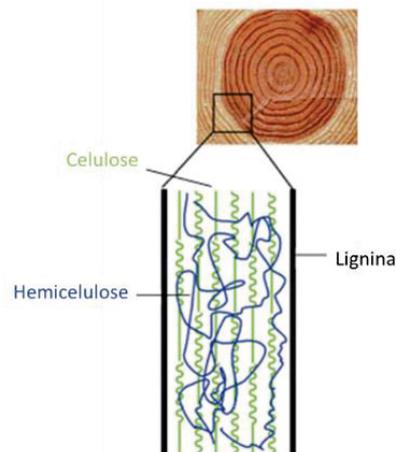
Como relatado, o pinhão e seus constituintes apresentam em sua composição alto teor de compostos com propriedades antioxidantes. Ainda, outra propriedade muito pouco explorada do maior resíduo do pinhão, ou seja, a casca, está relacionada ao potencial para biomassa, devido a presença do complexo lignocelulósico, podendo ser precursora para síntese de diferentes produtos, tais como o bioetanol e nanomateriais (CAPOLUPO; FARACO, 2016; LIMA *et al.*, 2020).

3.3. BIOMASSA: DEFINIÇÕES E FUNDAMENTOS

A biomassa pode ser definida como um recurso energético natural de origem vegetal, e uma de suas principais aplicações a síntese de biocombustíveis como o bioetanol. Atualmente, diversas matrizes são utilizadas para a síntese de biocombustíveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba, que apresentam elevado teor de açúcares em sua composição, o milho e o trigo devido aos elevado teor de amido e o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, que apresentam altas quantidades de material lignocelulósico em sua estrutura (OGATA, 2013; ZHAO *et al.*, 2020).

O material lignocelulósico é composto majoritariamente por três componentes estruturais, sendo eles a celulose e hemicelulose e a lignina (FIGURA 4) (VU *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020).

FIGURA 4. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.



FONTE: Adaptado de GUO *et al.*, 2019

Com relação aos componentes do material lignocelulósico, a celulose se caracteriza por ser um homopolissacarídeo linear, composto por monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas, apresentando alto grau de polimerização. Os polímeros de celulose ligam-se através das interações de hidrogênio, e são organizados sob a forma de microfibrilas, constituídas de regiões mais organizadas, denominadas

regiões cristalinas e regiões menos ordenadas, denominadas regiões amorfas (HUBBE *et al.*, 2018; LING *et al.*, 2020).

A hemicelulose é um heteropolímero formado por diferentes repetições de pentoses, hexoses e grupos acetila. Além disso, a hemicelulose não apresenta regiões cristalinas, e normalmente encontra-se ligada diretamente à lignina. Por fim, a lignina é uma macromolécula não polimérica e amorfa, sua composição é baseada em componentes fenólicos derivados dos precursores monoméricos (CARRIER *et al.*, 2011; PHANTHONG *et al.*, 2018).

A interação entre celulose, hemicelulose e lignina confere caráter recalcitrante ao material lignocelulósico dificultando o acesso à celulose. Assim, torna-se necessário o emprego de procedimentos, denominados pré-tratamentos, os quais possuem função de quebrar a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica e conseqüentemente, facilitar o acesso aos constituintes internos (VU *et al.*, 2020). No entanto, o uso dessas técnicas, demandam alto gasto energético e contribuem para a formação de compostos tóxicos e indesejados, tais como furfural e hidroximetilfurfural. Além disso, toda a fração de compostos bioativos provenientes das matrizes é removida devido ao uso de reagentes químicos e elevadas temperaturas de processo (BEHERA *et al.*, 2014; CAPOLUPO; FARACO, 2016).

Nesse contexto, com o objetivo de explorar todos os benefícios do pinhão utilizando processos verdes, o moinho de pedras surge como potencial alternativa de processo. O emprego do moinho proporciona como principal vantagem a obtenção de nanosuspensões, preservando principalmente a fração de biocompostos presentes na matriz (ALIABADI *et al.*, 2020).

3.3.1. Uso do moinho de pedras para a produção de nanosuspensões

O moinho de pedras (FIGURA 5) é um método físico que consiste em um processo mecânico de homogeneização, que promove a exposição e a abertura da superfície das fibras através do cisalhamento. Esse processo é responsável por reduzir o tamanho das fibras em escala nanométrica (0,1 a 100 nm) (LIMA *et al.*, 2020).

FIGURA 5: MOINHO DE PEDRAS UTILIZADO PARA SÍNTESE DE NANOSUSPENSÕES.



FONTE: O autor (2024).

A utilização do moinho de pedras proporciona um aumento da área de contato e melhor ligação entre as fibrilas, conferindo maior resistência (SERPA GUERRA *et al.*, 2020). Como resultado, ocorre a formação de uma nanosuspensão, caracterizada pela presença de materiais em escala nanométrica suspensos em um solvente, podendo apresentar um aspecto de gel a depender da matriz utilizada para a produção (FIGURA 6) (ALIABADI *et al.*, 2020; TIMM *et al.*, 2020).

FIGURA 6. NANOSUSPENSÃO DE CELULOSE BRANQUEADA DE PINUS OBTIDA A PARTIR DO MOINHO DE PEDRAS.



FONTE: Adaptado de Kumode e colaboradores (2017).

Uma das principais vantagens da produção de nanosuspensões a partir do moinho de pedras é o emprego de baixas temperaturas de processo e o uso de água para sua síntese. Além disso, o moinho é um método simples, rápido, econômico, atóxico e de alto rendimento para a desfibrilação da celulose e produção da nanosuspensão. Dependendo da matriz utilizada, o emprego do moinho de pedras para a síntese de nanosuspensões é capaz de preservar propriedades benéficas à saúde humana, tais como a atividade antioxidante proveniente dos compostos bioativos (LIMA *et al.*, 2020; TIMM *et al.*, 2020).

3.3.2. Aplicações das nanosuspensões

Atualmente, as nanosuspensões são utilizadas em materiais poliméricos, devido a sua baixa massa molar e as suas excelentes propriedades mecânicas (PHANTHONG *et al.*, 2018). Além disso, seu uso também já foi relatado na medicina para a elaboração de enxertos de pele e curativos, devido à sua alta biodegradabilidade e biocompatibilidade (CLARO *et al.*, 2020; CURVELLO *et al.*, 2019; PHANTHONG *et al.*, 2018).

Guimarães e colaboradores (2016) realizaram a síntese de nanosuspensões a partir da cenoura como aditivo para filmes à base de amido. A partir desse estudo foi possível observar que a adição das nanosuspensões possibilitou conferir ao filme uma maior resistência a tração e baixa permeabilidade ao vapor de água quando comparados aos filmes sem a adição da suspensão.

Em estudo desenvolvido por Aliabadi e colaboradores (2020), os autores aplicaram o extrato de erva-mate na síntese de filmes provenientes da nanosuspensão de celulose. Nesse trabalho, os filmes à base de erva-mate e os produzidos sem a adição do extrato foram avaliados quanto as propriedades antioxidantes, antibacterianas e toxicidade dos filmes. A partir desse estudo, os autores observaram que os filmes produzidos com o extrato da erva-mate exibiram atividade antibacteriana e maior atividade antioxidante quando comparado ao filme padrão, sem a adição do extrato. Por fim, os autores não identificaram toxicidade em ambos os filmes produzidos.

Com relação ao emprego do pinhão na síntese de nanosuspensões, foram identificados trabalhos relacionados ao uso de sua casca. Lima e colaboradores (2020), realizaram a síntese, caracterização e aplicação de nanosuspensões da casca do pinhão, branqueadas e não branqueadas empregando o moinho de pedras, com um teor de sólidos de 6%. Ambas as nanosuspensões à base de casca do pinhão (branqueadas e não branqueadas), foram aplicadas como suplemento na dieta diária de ratos, sendo avaliado o potencial de redução de níveis de colesterol e triglicerídeos. Como resultado, os autores constataram que não houve diminuição do índice de triglicerídeos e colesterol nos animais. No entanto, a alta presença de fibras auxiliou na perda de massa dos animais. Também foram feitas análises nos órgãos principais dos animais, que poderiam ter sido afetados pela ingestão da suspensão, não sendo constatado nenhuma toxicidade ou danos nos órgãos dos animais avaliados.

Em pesquisa publicada por Timm e colaboradores (2020), avaliou-se a síntese de nanosuspensão proveniente da casca do pinhão empregando o moinho de pedras, à uma concentração mássica de 5% de sólidos totais. As nanosuspensões foram aplicadas na elaboração de barras de cereais com a finalidade de desenvolver um novo produto alimentício rico em fibras alimentares. Como resultado, observou-se que as barras de cereais contendo nanosuspensão da casca do pinhão apresentaram propriedades funcionais. Além disso, os autores constataram que o teor de fibras presentes nas barras contendo a nanosuspensão foi quase duas vezes maior quando comparadas com as barras de cereais comerciais. Por fim, com relação à análise sensorial, os autores verificaram que a barra de cereal apresentou resultados promissores nos testes de aceitabilidade.

3.4. APLICAÇÕES DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO E SEUS CONSTITUINTES

Uma das principais alternativas para a manutenção da araucária é o desenvolvimento e valorização de produtos provenientes dessa espécie, surgindo como uma nova fonte de renda para as comunidades rurais (BRANCO; RODRIGUES, 2016).

Dentre os principais produtos provenientes da araucária, o pinhão apresenta potencial de saudabilidade. O pinhão e seus constituintes possuem alto valor nutricional e exibem benefícios à saúde humana. No entanto, a perecibilidade do pinhão, aliada a falta de industrialização e à sazonalidade de produção faz com que sua comercialização seja feita quase que totalmente *in natura* e nas proximidades da região de produção (DAUDT *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2020).

Para mudar esta realidade, é necessário o desenvolvimento de processos e produtos que valorizem o pinhão e seus constituintes, tornando o mercado mais atrativo aliado ao uso sustentável, auxiliando na conservação da espécie e agregando valor ao pinhão e seus constituintes para o emprego no desenvolvimento de novos produtos (LIMA *et al.*, 2020; TIMM *et al.*, 2020).

3.4.1. Formulações cosméticas

Um dos principais problemas relacionados à pele humana é o aparecimento de rugas e envelhecimento sendo atribuído, na maior parte das vezes, à exposição ao sol, que causa danos à pele devido à radiação ultravioleta. Como forma de combate aos sinais de envelhecimento ocasionados pela exposição ao sol, são utilizados produtos cosméticos a fim de minimizar os danos causados a pele (DAUDT *et al.*, 2015).

A crescente demanda na indústria de cosméticos, interligada ao constante desenvolvimento tecnológico e a síntese de produtos ecologicamente corretos aumenta a procura por matrizes naturais que apresentem benefícios cutâneos. Dentre estes produtos naturais, destacam-se os biocompostos presentes nas plantas, flores e frutos. Assim, devido à presença de diferentes biomas e uma diversidade de plantas, o Brasil é muito importante na indústria de cosméticos (CLARO *et al.*, 2020; DAUDT *et al.*, 2014, 2015).

Dentre as principais áreas da indústria de cosméticos, o setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos cresce muito no Brasil a cada ano, devido ao lançamento de produtos para o corpo humano, tais como a pele e o cabelo. Uma das principais ideias para conquistar os consumidores é proporcionar produtos, que em pouco tempo,

apresentem bom resultado visual, tais como cremes hidratantes antienvelhecimento e máscaras faciais (BONGAO *et al.*, 2020).

Atualmente, a síntese de cremes está diretamente relacionada ao campo de nanopartículas, tais como os óxidos metálicos. Esses nanomateriais são adaptados para absorver a energia dos raios ultravioleta, prevenindo danos à pele e doenças de pele relacionadas aos raios ultravioletas. Dentre as ações dos nanocompostos na pele, é importante destacar a eliminação de radicais livres que causam danos às células e promovem uma diminuição da flexibilidade celular (BONGAO *et al.*, 2020).

Dentre as tecnologias emergentes no campo dos cosméticos é importante destacar o emprego da nanosuspensão de celulose, podendo ser incorporada como um aditivo para modificar propriedades para aplicações específicas. O emprego dessa nanoestrutura já possui efeito comprovado como ação curativa e apresenta grande potencial para a aplicação em cosméticos (BONGAO *et al.*, 2020; CLARO *et al.*, 2020).

Com relação aos trabalhos encontrados na literatura utilizando o pinhão e seus constituintes para a síntese de cosméticos, somente foi encontrado o uso do amido como ação potencial para a produção de cremes (DAUDT *et al.*, 2015). No entanto, a casca do pinhão é de grande interesse para o emprego em cremes, uma vez que a demanda por nanoestruturas que modifiquem as propriedades dos produtos cosméticos, gerando benefícios ao usuário é extremamente alta.

3.4.2. Máscaras faciais

Atualmente, diversas alternativas estão surgindo para a constante manutenção e melhora das propriedades da pele humana, tais como limpeza, hidratação e antienvelhecimento. Nesse contexto, a indústria cosmética tem grande crescimento e aumento de lucros em produtos para *skin-care*, tais como sabonetes, hidratantes, água micelar, protetores solares e máscaras faciais (MORGANTI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2023).

As máscaras faciais tem apresentado grande aumento de consumo nos últimos anos, arrecadando cerca de U\$ 37 bilhões em 2018, e com estimativa para U\$ 51 bilhões

em 2025 (SILVA *et al.*, 2023). Dentre as principais características das máscaras faciais é importante destacar sua ação hidratante e antienvhecimento, retardando o aparecimento de rugas e linhas faciais. No entanto, existem dificuldades para o desenvolvimento de máscaras faciais, tais como a obstrução ou irritação da pele, enquanto que para peles oleosas é necessário grande atenção com o aparecimento de acne e aumento das bactérias na superfície da pele (ALMEIDA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2023)

Normalmente, as máscaras são produzidas por constituintes de base fóssil e fundidos, ou por técnicas emergentes, como extrusão de filme texturizado (MORGANTI *et al.*, 2020). Entretanto, polímeros naturais, como polissacarídeos como a celulose bacteriana, e polímeros de base biológica sintetizados a partir de monômeros renováveis têm-se apresentado como potenciais alternativas válidas a essas versões de base fóssil, (MORGANTI *et al.*, 2020). Além disso, a nanocelulose também apresenta grande potencial de aplicação para a produção de máscaras faciais, uma vez que proporciona fácil adição de biocompostos na formulação, podendo conferir ao produto propriedades cosmeceúticas (ALMEIDA *et al.*, 2022; HAMMAM *et al.*, 2023).

Na literatura, não existem relatos da produção e aplicação da nanosuspensão do pinhão integral na produção de máscaras faciais. A produção das máscaras faciais a partir da nanosuspensão do pinhão integral é um processo de aproveitamento total da matriz, sem a geração de resíduos. A presença de macromoléculas como o amido e os constituintes do complexo lignocelulósico apresentam propriedades promissoras para o desenvolvimento de máscaras faciais, tais como biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de elevada atividade antioxidante devido a presença de compostos bioativos.

3.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE

Por meio da revisão bibliográfica, foi possível verificar que o pinhão é muito importante para a economia das famílias regionais do sul e sudeste do Brasil. Além disso, apresenta benefícios nutricionais, tais como alto teor de amido e atividade antioxidante.

Dentre os biocompostos presentes no pinhão destacam-se os compostos fenólicos, flavonoides e fitoesteróis. Esses compostos apresentam grandes benefícios à saúde humana, e são amplamente utilizados industrialmente.

Com relação ao emprego da amêndoa do pinhão ou a farinha do pinhão, são utilizados como aditivos para a produção de alimentos, como barras de cereais, pães e bolos sem glúten e de baixo índice glicêmico. No entanto, outros potenciais de aplicação têm chamado interesse, tais como a área de cosméticos e fármacos.

A casca do pinhão é o maior resíduo gerado da semente, e possui em sua constituição a presença de compostos bioativos e fibras, os quais são de grande interesse industrial e para a saúde humana. Além das propriedades anteriormente relatadas, a casca do pinhão possui em sua composição a presença do complexo lignocelulósico, composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, apresentando estrutura recalcitrante.

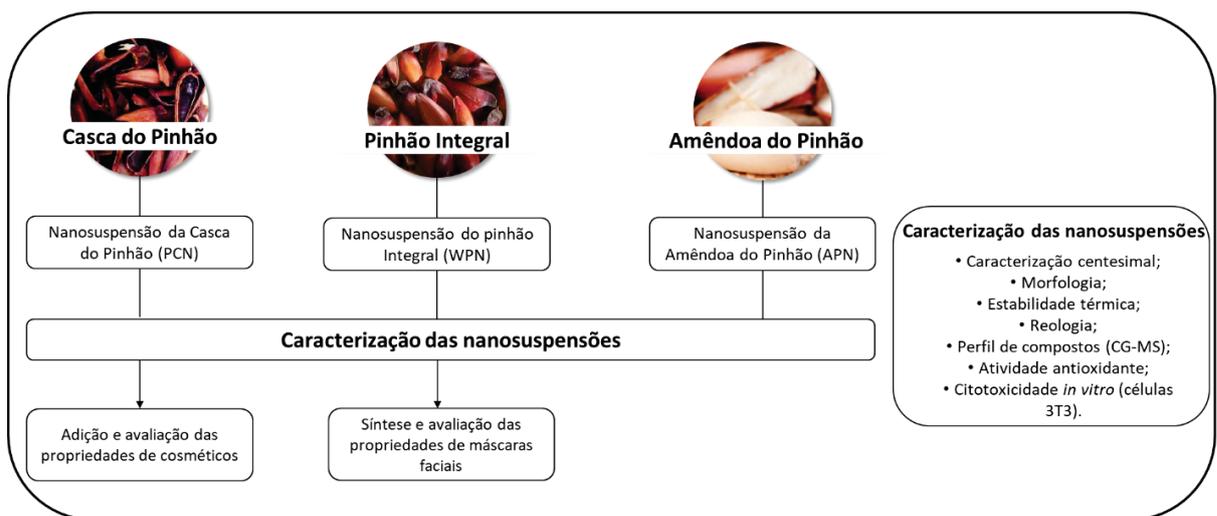
Para a quebra da estrutura recalcitrante e consequente acesso as macromoléculas presentes no complexo lignocelulósico são necessários pré-tratamentos, sendo muitas vezes invasivos a matriz e ao meio ambiente. Assim, como forma de valorizar as propriedades da matriz, o moinho de pedras merece destaque, uma vez que apresenta benefícios como: baixa toxicidade, emprego de baixas temperaturas e uso de solventes atóxicos no processo, sendo possível o aproveitamento da fração de biocompostos presentes da matriz.

Como resultado, a nanosuspensão formada através do uso do moinho de pedras e água, apresenta alto teor de biocompostos e propriedades físicas completamente diferentes das amostras *in natura*. Assim, as nanosuspensões apresentam grande potencial para a aplicação em processos alimentícios, cosméticos e fármacos, conferindo alto caráter antioxidante e aplicabilidade para o desenvolvimento de produtos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção será abordada toda a metodologia de processamento, caracterização e aplicação das nanosuspensões provenientes do pinhão, como descrito na FIGURA 7. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Produtos Madeiráveis (LTPM) e no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis (LTPNM), situados na Embrapa-Florestas. A estrutura do Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) também foi utilizada em parceria com o Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS), do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR.

FIGURA 7. FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.



FONTE: O autor (2024).

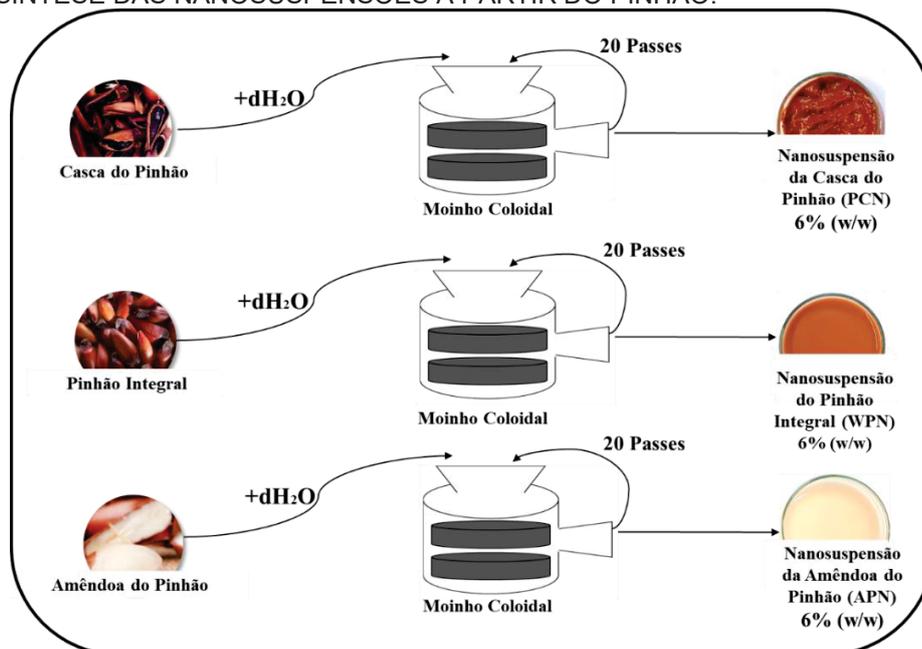
4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DAS NANOSUSPENSÕES

Os pinhões foram coletados na Embrapa Florestas, submetidos ao processo de seleção e higienizados. Em seguida, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçado (FABBE®), à temperatura constante de 45 °C, até umidade de 6,03 ± 0,82 %. Em seguida, as partes do pinhão foram separadas (casca e amêndoa),

acondicionadas em sacos a vácuo e armazenadas a temperatura ambiente, na ausência de luz.

A produção das nanosuspensões (FIGURA 8) foi realizada após a etapa de secagem do pinhão integral, da casca e da amêndoa. Deste modo, foram obtidas as nanosuspensões do pinhão integral (WPN), da casca (PCN) e da amêndoa do pinhão (APN). Para isso, foi adicionado ao moinho de pedras (Modelo MKCA6-4; Masuko Sangyo Co., Ltd.) água deionizada e a amostra na concentração de 6% sólidos totais (m/m) (FIGURA 8). O moinho consiste em duas pedras, em que a partir de um ajuste é possível controlar o tamanho das fibras. Os parâmetros técnicos em relação ao uso do moinho foram fixados em 1.500 rpm; 20 passes e distância entre os discos de 0,1 mm

FIGURA 8: SÍNTESE DAS NANOSUSPENSÕES A PARTIR DO PINHÃO.



FONTE: O autor (2024).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOSUSPENSÕES

As amostras (WPN, PCN e APN) foram caracterizadas em relação aos teores de umidade, cinzas, proteínas, fibras alimentares, lipídios e carboidratos totais conforme as metodologias descritas pela AOAC (1995) e pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). A umidade

foi determinada por gravimetria através de secagem em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de cinzas foi quantificado a partir da incineração em mufla a 550 °C das amostras. O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. Já as fibras alimentares totais, foram analisadas pelo método enzimático-gravimétrico empregando o kit Megazyme®. O teor de lipídeos foi determinado por extração em Soxhlet utilizando éter etílico. Por fim, o teor de carboidratos totais foi calculado por diferença. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em base seca.

A composição mineral foi obtida pesando aproximadamente 0,5 g de amostras previamente secas. Sequencialmente, foram adicionados 4 mL de ácido nítrico e os tubos foram colocados no bloco digestor com aumento gradual de 50 °C até a temperatura de 150 °C até a digestão. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de ácido perclórico nos tubos e a temperatura foi elevada até 180 °C. A digestão total das amostras foi adquirida em cerca de seis horas. Após a digestão das amostras, restaram 0,5 mL de extrato mineral incolor, os quais foram resfriados e adicionados 15 mL de água de osmose reversa. As determinações de cobre, ferro, manganês, zinco, cálcio e magnésio foram realizadas utilizando um espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 200, Perkin Elmer®). Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos em mg/100g. \pm desvio padrão.

4.2.1. Avaliação morfológica das nanosuspensões

A morfologia das nanosuspensões foi avaliada através da microscopia de eletrônica de varredura – MEV (do inglês, *Scanning Electron Microscopy coupled with Field Emission Gun*). A técnica consiste na obtenção de imagens que facilitem a avaliação da topografia e das diferenças de composição química das amostras. As imagens foram obtidas em três ampliações diferentes (500x, 2kx e 75kx) em microscópio eletrônico de varredura por pistola de emissão de campo (MEV-FEG, FEI Quanta 450 FEG®) operando a 15kV.

4.2.2. Análise térmica das nanosuspensões

A estabilidade térmica das nanosuspensões foi determinada pelas metodologias propostas por Barbash e colaboradores (2019) e Daudt e colaboradores (2014) com algumas modificações, através do equipamento TGA (do inglês, *Thermogravimetric Analysis*). Dessa forma, 10 mg da amostra foi submetida à uma taxa de aquecimento de 10 °C / minuto em uma rampa de temperatura de 25 a 500 °C. A gelatinização do amido das nanosuspensões foi avaliada pela análise de DSC (do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*) a uma taxa de aquecimento de 5 °C / minuto, variando de 25 a 85 °C. Ambos os experimentos foram realizados com o equipamento SDT (Q600, TA Instruments®) sob fluxo de nitrogênio de 50 mL / min.

4.2.3. Avaliação do comportamento reológico das nanosuspensões

O comportamento reológico das nanosuspensões provenientes do pinhão foi realizado a fim de avaliar o perfil de viscosidade, as propriedades mecânicas e termomecânicas das amostras. Para isso, foi utilizado um reômetro (Discovery, HR10 TA Instruments®) equipado com um banho termostático HAAKE A10 (Thermo Scientific) com controle de temperatura, utilizando uma placa paralela com geometria hachurada ($\varnothing = 40$ mm; Gap = 300 μ m) a fim de evitar o processo de sinérese das amostras (SOUZA *et al.*, 2019)

Inicialmente, determinou-se o perfil de viscosidade das nanosuspensões a 25 °C a uma taxa de cisalhamento de 0 a 300 s⁻¹. Em seguida, a região viscoelástica linear das amostras foi avaliada através de uma varredura de deformação oscilatória (0,001 Pa – 100 Pa) na frequência de 1 Hz, em que o valor de tensão de cisalhamento de 1 Pa foi determinado para todas as nanosuspensões. Em outro experimento, o comportamento mecânico das amostras foi realizado pelo teste de varredura de frequência oscilatória (0,01 Hz -10 Hz), empregando tensão de cisalhamento de 1Pa, a 25 °C.

O comportamento termomecânico foi determinado através do teste de varredura de temperatura oscilatória a 10Hz, a uma taxa de aquecimento de 5 °C / minuto e variação de temperatura de 25 a 85 °C. Por fim, as amostras resultantes da análise termomecânica

foram resfriadas até 25 °C e uma nova varredura de frequência oscilatória foi realizada para verificar as propriedades mecânicas após o teste de oscilação de temperatura.

4.2.4. Perfil cromatográfico das nanosuspensões via CG-MS

O perfil cromatográfico dos biocompostos presentes nas nanosuspensões foi determinado pelo método descrito por Lima e colaboradores (2020), com modificações. Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração dos metabólitos, em que 40 mg de amostra seca foram adicionadas a 30 µL de ácido nonadecanóico (2 mg/mL) e 30 µL de 13^C – sorbitol (0.2 mg/mL) para padronização interna quantitativa da fase apolar e da fase polar, respectivamente. Em seguida, foi adicionado 1,2 mL etanol: tolueno (1:1). As amostras foram agitadas em vórtex e submetidas a agitação de 950 rpm no equipamento ThermoMixer®, durante 15 minutos à 70 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm e as fases de topo (lipofílica) e de fundo (hidrofílica) foram separadas.

Sequencialmente, amostras foram submetidas a secagem em Speed Vac, modo V-AQ por 10 horas, sem aquecimento. Por fim, as amostras foram submetidas a etapa de derivatização (fração hidrofílica), e esterificação e acilação (frações lipofílicas), para posterior injeção no cromatógrafo. A análise foi realizada a partir da técnica de cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massa (GC – MS) (Thermo Fisher /Focus® Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) acoplado ao detector MS Polaris Q ion trap, em modo split (1:50) com coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), a 230 °C (temperatura do injetor) utilizando hélio como gás carreador (1,5 mL. min⁻¹). O forno do cromatógrafo foi ajustado para 70 °C aquecendo até 320 °C a uma taxa de 8 °C/min. O espectrômetro de massa foi operado em modo de íon positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e uma temperatura da fonte de íons de 200 °C.

Os compostos hidrofílicos e hidrofóbicos encontrados em PCN, WPN e APN foram identificados via o software AMDIS® (do inglês *Automated Mass Spectral Deconvolution*, NIST) usando a biblioteca de referência do banco de dados Golm Metabolome para compostos hidrofílicos (Hummel et al., 2013) e biblioteca interna da

EMBRAPA para compostos lipofílicos (Lima et al., 2020). As quantificações foram realizadas no software XCalibur (Thermo Fisher®, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), em que as intensidades dos compostos (isto é, a altura dos picos) foram normalizados pelo peso das amostras e o padrão interno usando a soma do íon fragmento (m/z) característico de cada composto. Todos os experimentos em esta seção foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ amostra \pm desvio padrão.

4.2.5. Determinação da atividade antioxidante das nanosuspensões

Inicialmente, as nanosuspensões à base de pinhão foram submetidas a um processo de centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos, para a precipitação do sólido existente. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados para análise do potencial antioxidante, empregando as metodologias de capacidade redutora de compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, captura do radical livre DPPH, redução do íon ferro (FRAP) e captura do radical ABTS.

A capacidade redutora do teor de compostos fenólicos totais (FT) utilizada foi a de Folin-Ciocalteu, de acordo com (SINGLETON; ROSSI, 1965), com algumas alterações. Inicialmente foi adicionado 1,68 mL de água, na sequência, adiciona-se 20 μL do extrato diluído em água (1:10 v/v) e 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu em tubos de ensaio. Após 3 minutos, é adicionado uma solução de Na_2CO_3 20% (m/v) para que a reação seja interrompida. As amostras foram mantidas por 60 minutos ao abrigo da luz e submetidas a leitura no comprimento de onda de 760nm em espectrofotômetro (UV-vis, Shimadzu® UV-1800). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama de amostra (mg ácido gálico equivalente/ g amostra).

A determinação de capacidade antioxidante por DPPH foi realizada segundo (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995), com algumas modificações. O reagente 2,2 difenil-1-picril-hidracila (DPPH) em ação com um antioxidante, alterando a coloração da solução antes de coloração violeta escuro para violeta claro. Para isso, uma solução de DPPH· (10 μmol / L) foi preparada utilizando solução tampão de hidróxido de sódio (pH 6,0) e

etanol, em iguais proporções. Sequencialmente, 50 µL de cada extrato devidamente diluído foi misturado com 1,95 mL de solução DPPH. A reação foi realizada por 30 minutos na ausência de luz. A absorbância das amostras foi analisada no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro UV-vis (UV-1800, Shimadzu). Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de trolox por grama de amostra ($\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{amostra}}$).

A atividade antioxidante por FRAP foi realizada segundo (BENZIE; STRAIN, 1996), com algumas modificações. Consiste na redução do íon ferro (Fe III), pela geração de uma solução de coloração amarela clara, para Fe II, de solução de coloração azul escura por ação do TPTZ (2,4,6- tri (2-piridil) -1,3,5 triazina). Inicialmente, preparou-se a solução de FRAP a partir de uma solução tampão de acetato de sódio a 300 mmol/L de pH= 3,6, cloreto férrico hexahidratado a 20 mmol/L e TPTZ 10 mmol/L, a qual foi diluída com ácido clorídrico a 40 mmol/L. Para a avaliação do potencial antioxidante, 1,35 mL do reagente FRAP juntamente com 45 µL da amostra ou padrão (trolox) e 135 µL de água deionizada. Após a agitação, aguardou-se 30 minutos de reação em ausência de luz. A leitura da absorbância da amostra foi realizada no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® 1800). Os resultados foram expressos em miligrama de trolox por grama de amostra ($\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{amostra}}$).

A atividade antioxidante por ABTS foi avaliada de acordo com metodologia proposta por Miller e colaboradores (1993) e alterada por Rufino e colaboradores (2010), através da obtenção do radical ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) obtido pela oxidação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM), sendo então reduzido na presença de um doador de prótons pela amostra antioxidante, por um período de 16 horas. Foram misturados 100 µL de amostra diluída e 2,9 mL do reagente ABTS. A leitura foi efetuada no comprimento de onda de 734 nm, em espectrofotômetro (Shimadzu® 1800). Os resultados foram expressos em miligrama de trolox por grama de amostra ($\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}_{\text{amostra}}$).

4.2.6. Avaliação da citotoxicidade das nanosuspensões em células 3T3

O potencial citotóxico das nanosuspensões foi avaliado pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) com base nas metodologias descritas por ALIABADI *et al.*, 2020 e LIMA *et al.*, 2022, empregando células de fibroblastos de camundongo (NIH 3T3). Inicialmente, as células 3T3 foram incubadas a 37 °C em uma incubadora com concentração de 5% CO₂, em meio DMEM (Gibco®), contendo glucose (1g/L). Em seguida, as células foram expostas por 24h em diferentes concentrações a partir da diluição das nanosuspensões (0,6%, 0,2%, 0,05%, 0,01%, m/m). Depois disso, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, e adicionadas em 100 µL de meio sem soro contendo corante de sal de tetrazólio amarelo (1 mg/mL). Em seguida as amostras foram incubadas por 3h a 37 °C e após esta etapa, o sobrenadante foi removido e o produto (formazan residual roxo) foi solubilizado em 100 µL de dimetilsulfóxido. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 570 nm (BioTek Synergy HT, Swindon, Reino Unido). Os resultados foram expressos de acordo com a EQUAÇÃO 1.

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \frac{\text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{Controle}} - \text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{Controle}}} \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

4.3. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO

A nanosuspensão da casca do pinhão foi adicionada e homogeneizada à uma formulação base de creme comercial, em que se avaliou diferentes concentrações da PCN (TABELA 1) com relação aos parâmetros de cor, odor, pH (pHmetro, Marte®), espalhabilidade e estabilidade primária. Além disso, as formulações adicionadas da PCN foram avaliadas quanto a estabilidade térmica acelerada, comportamento reológico, citotoxicidade e potencial curativo. Todos os ensaios foram realizados de acordo com o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

TABELA 1: FORMULAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA ADIÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO.

Cremes Elaborados	Suspensão Casca do pinhão (g)	Formulação Base* (g)	Massa total (g)
Controle	0,00	50,00	50,00
F1	0,25	49,75	50,00
F2	0,50	49,50	50,00
F3	0,75	49,25	50,00
F4	1,00	49,00	50,00

FONTE: O autor (2024).

*A formulação base é composta por Unibase® (12%) Chmylan (Agla®) (3.0%), Ácido Caprílico (2.9%), Glicerol (3.5%) e Água (79.5%).

4.3.1. Avaliação da cor das formulações

A cor das formulações a base de PCN foi analisada utilizando colorímetro Mini Scan Ez® (Hunterlab, Reston), sendo avaliados os parâmetros L* (luminosidade), a* (coordenada verde-vermelho) e b* (coordenada azul-amarelo). A leitura foi realizada em diferentes regiões das formulações, totalizando dez pontos aleatórios. A variação de cor (ΔE) das formulações adicionadas de PCN e a formulação controle foi determinada conforme EQUAÇÃO 2.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

Onde ΔL , Δa e Δb são as diferenças obtidas para os valores de “L”, “a” e “b” entre a formulação controle e as formulações a base de PCN, respectivamente.

4.3.2. Avaliação da estabilidade primária das formulações

A avaliação da estabilidade primária dos cremes foi realizada empregando teste de centrifugação, conforme a metodologia descrita por Sim e Nyam (2021). O creme adicionado da suspensão foi submetido ao processo de centrifugação a 3750 rpm por 30 min. Os parâmetros utilizados no teste de centrifugação simulam a ação gravitacional na amostra por 1 ano, sendo possível determinar a sua estabilidade.

4.3.3. Avaliação da espalhabilidade das formulações

A espalhabilidade das formulações foi determinada utilizando o método de placas paralelas, segundo metodologia descrita por Sim e Nyam (2021). O creme (1g) foi adicionado sobre uma das lâminas de vidro (20 × 20 cm). Em seguida, a outra lâmina foi colocada no topo da amostra e o peso de 100 g colocado na lâmina superior, para garantir que a amostra seja pressionada uniformemente. Após 1 minuto, o peso foi removido e o diâmetro de espalhamento foi medido. A espalhabilidade das formulações foi expressa em cm².

4.3.4. Avaliação das propriedades reológicas das formulações obtidas

O comportamento reológico dos cremes à base da PCN foi realizado a fim de avaliar seu perfil de viscosidade, propriedades mecânicas e termomecânicas. Para isso, foi utilizado um reômetro (Discovery, HR10 TA Instruments®), equipado com um banho termostático HAAKE A10 (Thermo Scientific) com controle de temperatura. Utilizou-se a geometria cone-placa ($\varnothing = 40$ mm; Gap = 300 μ m) em todos os experimentos.

O perfil de viscosidade das formulações foi avaliado sob uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 300 s⁻¹. Em seguida, determinou-se a faixa viscoelástica linear das amostras, através da varredura de deformação oscilatória (0,001 Pa –100 Pa) na frequência de 1 Hz, sendo escolhido a tensão de 1Pa para os posteriores experimentos mecânicos por estar dentro da região viscoelástica linear.

Sequencialmente, foi realizado o teste de varredura de frequência oscilatória (0,01 Hz -10 Hz) empregando tensão de cisalhamento de 1Pa, a 25 °C. Por fim, o comportamento termomecânico das formulações foi avaliado empregando o teste de varredura de temperatura a 10Hz, utilizando taxa de aquecimento de 5 °C / min e variação de temperatura de 5 °C a 50 °C, durante vários ciclos de aquecimento-resfriamento. Essa avaliação tem como finalidade verificar a estabilidade térmica e o tempo de armazenamento das formulações cosméticas.

4.3.5. Avaliação da citotoxicidade das formulações

A citotoxicidade das formulações a base de PCN foi realizada a partir do ensaio de viabilidade celular baseado na metodologia colorimétrica MTT empregando células de fibroblastos de camundongo (NIH 3T3), fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) e células de cultura celular de queratinócitos humanos (HaCaT), conforme descrito por Aliabadi e colaboradores (2020) e Lima e colaboradores (2019). Portanto, as células 3T3, NHDF e Hacat foram inicialmente incubadas em meio DMEM (Gibco®) sob 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram expostas por 24 horas a cada formulação diluída nas seguintes concentrações: 0,02 0,05 e 0,125 mg/mL. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, adicionadas a 100 µL de meio isento de soro contendo corante sal amarelo de tetrazólio (1 mg/mL) e incubadas por 3 horas a 37 °C. O sobrenadante obtido foi removido e o produto roxo residual foi solubilizado em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As absorbâncias foram medidas a 570 nm (BioTek Synergy HT, Swindon, Reino Unido) e os resultados foram expressos em viabilidade celular (%), como mostrado na (EQUAÇÃO 3).

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \frac{\text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{Controle}} - \text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{Controle}}} \quad (\text{EQUAÇÃO 3})$$

4.3.6. Avaliação do potencial curativo das formulações

O potencial curativo celular das formulações a base de PCN foi conduzido seguindo os protocolos descritos por Sperotto e colaboradores (2018). Para isso, células HaCaT foram cultivadas por 24 horas em uma placa de 6 poços até atingirem 90-100% de confluência na superfície. Em seguida, foi realizada uma raspagem utilizando a ponta de uma micropipeta de 200 µL. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e as formulações foram testadas nas concentrações de 0,02% e 0,125%. O controle negativo (CN) consistiu de meio fresco isento de soro DMEM, e o controle positivo (CP) consistiu

de meio fresco suplementado com 10% de soro fetal bovino. As imagens foram capturadas instantaneamente (0h) e nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o início do experimento. As áreas arranhadas foram quantificadas utilizando o software ImageJ® (National Institutes of Health em Bethesda, MD, EUA). O processo de cicatrização celular foi avaliado através do fechamento da incisão realizada em função do tempo.

4.4. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DO PINHÃO INTEGRAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÁSCARAS FACIAIS

4.4.1. Síntese das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão

As máscaras faciais à base da nanosuspensão do pinhão integral foram sintetizadas através da metodologia de *casting* desenvolvida por Laureanti e colaboradores (2021) com modificações. Assim, as amostras foram preparadas dissolvendo o plastificante (glicerol) na nanosuspensão do pinhão integral, em concentrações previamente estabelecidas, como demonstrado na TABELA 2. Sequencialmente, as misturas foram aquecidas a 70 °C e agitadas constantemente até completa gelatinização do amido e homogeneização. Por fim, a solução foi disposta em placas de Petri e secas em estufa a 30°C por 24 h.

TABELA 2: MÁSCARAS FACIAIS SINTETIZADAS A PARTIR DO PINHÃO.

Filmes Sintetizados	Suspensão pinhão integral (g)	Plastificante (g)	Água (g)	Amido (g)	Massa total na placa (g)
MPI1	60,8	0,6	-	-	61,4
MPI2	60,4	1	-	-	61,4
MC	-	0,6	58,8	2	61,4

FONTE: O autor (2024).

Inicialmente, as propriedades dos filmes foram avaliadas, sendo realizadas as análises de morfologia (MEV-FEG, FEI Quanta 450 FEG®) operando a 20kV, conforme metodologia descrita no item 4.2.1. Em seguida, as amostras foram caracterizadas quanto a sua cor utilizando colorímetro (Mini Scan Ez® (Hunterlab, Reston), conforme metodologia descrita 4.3.1. Ainda a espessura das máscaras foi avaliada utilizando o Micromêtro (Digimic Micrometer; Mitutoyo, JPN). Em seguida, as máscaras faciais

obtidas a partir do pinhão foram caracterizadas quanto sua hidrofiliicidade, propriedades mecânicas, liberação de compostos bioativos, citotoxicidade, propriedades curativas e biodegradabilidade. As metodologias empregadas nesta seção estão descritas nos tópicos seguintes.

4.4.2. Avaliação da umidade e solubilidade das máscaras faciais

A umidade das máscaras faciais foi avaliada através dos dados de umidade e solubilidade de filmes biodegradáveis (SILVA *et al.*, 2019). Para determinar o teor de umidade (U%), as amostras foram pesadas (m_1), e em seguida foram acondicionadas em estufa com circulação de ar a 60 °C por 24h. Sequencialmente, os filmes foram pesados após a secagem (m_2) e a umidade foi calculada através da EQUAÇÃO 4.

$$U(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

A determinação da solubilidade dos filmes ocorreu a partir da adição de 200 mL de água destilada em um béquer de vidro seguido do acondicionamento em banho termostático à 25 °C por 24 horas. Na sequência, as amostras foram retiradas da água e submetidas ao processo de secagem em estufa a 60 °C por 24 horas. Por fim, as amostras foram pesadas (m_3) e a solubilidade dos filmes foi calculada através da EQUAÇÃO 5.

$$\text{Solubilidade em água}(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_3} \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

Os resultados de umidade e solubilidade em água das máscaras faciais foram expressos em porcentagem (%).

4.4.3. Avaliação das propriedades mecânicas das máscaras faciais

As propriedades mecânicas (resistência à tração e alongação) das máscaras faciais foram avaliadas antes e após a imersão em água no texturômetro (Texture Analyser (TA.XTplus®), de acordo com norma padrão de resistência à tração ASTM D882-18. A distância inicial de prensão foi fixada em 100 mm, a uma velocidade de 1 mm/s. As amostras foram retiradas de diferentes regiões do filme e os resultados de resistência à tração e alongação foram expressos em MPa e porcentagem, respectivamente.

4.4.4. Liberação dos compostos bioativos *in vitro*

A liberação dos compostos bioativos presentes nas máscaras faciais foi realizado conforme metodologia de Aliabadi e colaboradores (2020), com algumas modificações. As máscaras (1g) foram adicionadas em erlenmeyers contendo 20 mL de água deionizada. Em seguida, a fim de simular as condições cutâneas, o conjunto foi vedado e alocado em shaker orbital (Ethik®) com rotação fixada em 60 rpm, à 36 °C. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 100 µL a cada dois minutos dos sistemas, até tempo final de vinte minutos. Em seguida, foram realizadas as análises de TPC e DPPH, descritas no item 4.2.5. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mg}_{\text{ácido gálico equivalente}} / \text{g}_{\text{amostra}}$) e em miligramas de trolox por grama de amostra ($\text{mg}_{\text{Trolox}} / \text{g}_{\text{amostra}}$) em função do tempo (minutos).

4.4.5. Avaliação da citotoxicidade das máscaras faciais

A citotoxicidade das máscaras faciais foi realizada a partir do ensaio de viabilidade celular baseado na metodologia colorimétrica MTT empregando células de fibroblastos de camundongo (NIH 3T3) e fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF), conforme descrito anteriormente no item 4.3.5, sendo avaliadas as seguintes concentrações: 1,0; 5,0; e 12,5 mg/mL. Posteriormente, as absorbâncias foram medidas a 570 nm (BioTek Synergy HT, Swindon, Reino Unido) e os resultados foram expressos em viabilidade celular (%), como demonstrado na (EQUAÇÃO 3).

4.4.6. Avaliação da biodegradabilidade das máscaras faciais

A biodegradabilidade das máscaras faciais foi determinada a partir da metodologia descrita por Laureanti e colaboradores (2021) com algumas modificações. As amostras de filme (4 cm²) foram secas em estufa à 60 °C até massa constante. Em seguida, as amostras foram armazenadas em caixas plásticas e cobertas com substrato (TERRAL[®]), a uma profundidade de 2 cm e mantidas a umidade constante de 60% a fim de simular a sua degradação na natureza. As máscaras faciais foram removidas do substrato a cada 7 dias, lavadas cuidadosamente e secas até massa constante. As máscaras à base de pinhão foram avaliadas em quadruplicada até a completa decomposição. A biodegradabilidade das amostras foi calculada pela perda de massa, conforme a EQUAÇÃO 6.

$$\text{Biodegradabilidade(\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \quad \text{EQUAÇÃO 6}$$

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram avaliados considerando a normalidade e homocedasticidade. A análise de variância aplicada foi a ANOVA (p <0,05) para os dados com normalidade confirmada e o teste de Tukey foi utilizado para estimar as diferenças das médias. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo avaliados um número de três repetições utilizando o software Statistica[®] (v. 10.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOSUSPENSÕES PROVENIENTES DO PINHÃO E SEUS CONSTITUINTES¹

Inicialmente, as nanosuspensões foram sintetizadas em moinho de pedras com os componentes secos do pinhão, na concentração pré-fixada em 6% (m/m), como demonstrado na FIGURA 9.

FIGURA 9: NANOSUSPENSÕES OBTIDAS PARA CARACTERIZAÇÃO.



FONTE: O autor (2024).

Apesar das nanosuspensões apresentarem teor de sólidos totais semelhantes, é possível observar na FIGURA 9 que a amostra PCN apresentou uma maior consistência quando comparada com WPN e APN. Esse comportamento está relacionado com a presença do complexo lignocelulósico nas composições (LIMA *et al.*, 2020).

Além disso, o PCN e o WPN exibiram uma coloração mais escura quando comparada ao APN, o que está relacionado à presença da casca do pinhão, que é rica em compostos bioativos como os flavonoides, as antocianinas e os taninos (CASSONI *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Com relação a amostra APN, constatou-se a coloração

¹ * Esta seção encontra-se publicada na revista *Food Chemistry*, intitulada "Impact of defibrillation technique on the rheological, thermo-mechanical, and nutritional properties of nanosuspensions produced from multiple fractions of pinhão seed (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze)".

de tonalidade bege, devido à presença predominante do amido de pinhão em sua composição (CORDENUNSI *et al.*, 2004; DAUDT *et al.*, 2015).

5.1.1. Composição nutricional

A composição nutricional das nanosuspensões do pinhão e seus constituintes pode ser observado na TABELA 3.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO DAS AMOSTRAS SECAS.

		PCN***	WPN	APN
Composição Nutricional (%)*	Umidade	7.02 ± 0.20 ^{b**}	6.76 ± 0.14 ^c	7.33 ± 0.16 ^a
	Cinzas	1.31 ± 0.60 ^c	2.38 ± 0.11 ^b	2.98 ± 0.34 ^a
	Proteínas	2.10 ± 0.10 ^c	3.83 ± 0.19 ^b	4.89 ± 0.11 ^a
	Fibras Totais	63.12 ± 0.52 ^a	26.29 ± 0.81 ^b	8.56 ± 0.51 ^c
	Lipídeos	1.48 ± 0.13 ^c	1.74 ± 0.18 ^b	1.85 ± 0.17 ^a
	Carboidratos	24.97 ± 0.12 ^c	59.00 ± 0.13 ^b	74.39 ± 0.23 ^a
Composição mineral (mg. 100g ⁻¹)	Fósforo	90.00 ± 0.52 ^{c*}	362.03 ± 1.14 ^b	478.71 ± 3.06 ^a
	Potássio	399.00 ± 0.90 ^c	754.06 ± 2.07 ^b	905.66 ± 1.23 ^a
	Cálcio	32.03 ± 1.05 ^a	32.08 ± 0.09 ^a	32.07 ± 0.03 ^a
	Magnésio	93.12 ± 2.01 ^a	85.67 ± 3.02 ^b	81.42 ± 1.51 ^c
	Cobre	0.57 ± 0.13 ^a	0.30 ± 0.15 ^b	0.18 ± 0.17 ^c
	Ferro	14.20 ± 0.42 ^a	5.47 ± 0.23 ^b	1.72 ± 0.37 ^c
	Manganês	9.80 ± 0.61 ^a	3.52 ± 0.72 ^b	0.80 ± 0.47 ^c
	Zinco	3.97 ± 0.71 ^a	3.54 ± 0.16 ^b	3.30 ± 0.11 ^c

FONTE: O autor (2024).

Nota: *As nanosuspensões foram previamente secas antes da análise da composição nutricional. **Letras diferentes na mesma linha mostraram diferença significativa por ANOVA (teste Tukey LSD; p<0,05). ***PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

A partir dos dados de composição nutricional das nanosuspensões (TABELA 3), foi possível identificar altos teores de fibras alimentares e carboidratos, o PCN (63,12 ± 0.52%) é composto principalmente por fibra alimentar, enquanto que há uma presença predominante de carboidratos em APN (74,39 ± 0.23%) e WPN (59,00 ± 0.13%). Além disso, foi possível observar que a presença isolada da casca do pinhão na PCN contribuiu

para a maior presença de fibras alimentares totais em sua composição ($63,12 \pm 0,52$ %). A ingestão de fibras alimentares são de grande importância para a saúde humana, sendo interligadas principalmente, a prevenção de doenças, como por exemplo o diabetes, além de desempenham papel de reguladores intestinais (HE *et al.*, 2022; SHAH *et al.*, 2020; SPADA *et al.*, 2018).

O teor de carboidratos nas nanosuspensões foi identificado principalmente na APN ($74,62 \pm 0,23$ %) e WPN ($59,00 \pm 0,13$ %). Este fato está relacionado ao alto teor de amido presente na amêndoa do pinhão (CORDENUNSI *et al.*, 2004). Um dos benefícios do consumo deste alimento está relacionado a presença de amido resistente, que é capaz de retardar a digestibilidade da amêndoa e como consequência, reduzir a liberação de glicose no sangue. Dessa forma, o seu consumo pode ser interligado a prevenção de doenças como o diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (FERREIRA *et al.*, 2021; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017). Referente aos teores de proteínas, lipídios e cinzas, foram encontrados em baixas quantidades em todas as amostras avaliadas.

Com relação aos dados da literatura de composição nutricional obtidos das nanosuspensões do pinhão, Timm e colaboradores (2020), realizaram a caracterização da nanosuspensão da casca do pinhão, em que constataram um teor de $46,1 \pm 0,2$ % de fibras alimentares totais, $1,8 \pm 0,1$ % de proteínas, $44,0 \pm 0,1$ % de carboidratos e $6,0 \pm 0,8$ % de lipídeos. O teor proteico encontrado pelos autores foi próximo ao do presente estudo ($1,80 \pm 0,10$ %). No entanto, os valores de fibras totais, carboidratos e lipídeos apresentaram diferenças frente aos encontrados na PCN, o que pode estar relacionado a concentração da nanosuspensão do pinhão utilizada em cada análise, bem como as variações entre as amostras utilizadas neste trabalho e as empregadas pelos autores.

Quanto à composição mineral (TABELA 3), foram observados predominantemente a presença de potássio e fósforo em todas as nanosuspensões provenientes do pinhão e seus constituintes. Segundo a FDA, o alimento pode ser considerado uma excelente fonte de minerais se a ingestão diária desses nutrientes por porção for superior a 20% (USDA/DHHS, 2005). Assim, os teores de ambos os minerais encontrados nas amostras WPN e APN foram superiores ao percentual recomendado. Além disso, nas amostras PCN e WPN, o teor de magnésio correspondeu a mais de 20%

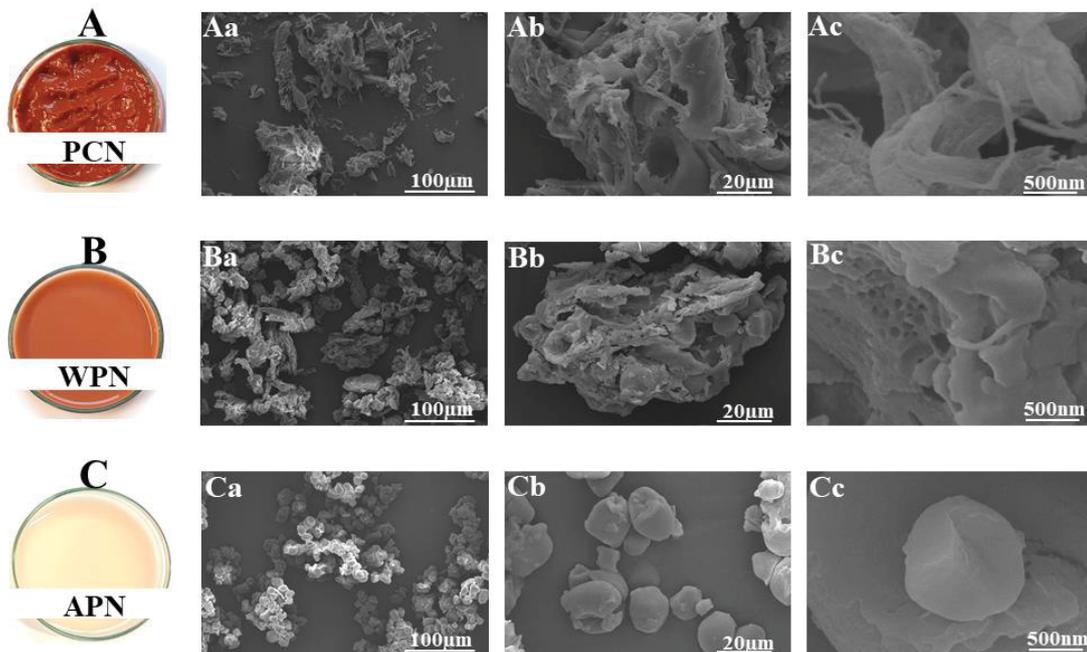
da ingestão diária recomendada. Ferro, manganês, zinco e cobre também foram observados em quantidades consideráveis, principalmente na amostra PCN.

No geral, as nanosuspensões de pinhão demonstraram ser uma fonte carboidratos e fibras alimentares, bem como de minerais, os quais desempenham funções cruciais no corpo humano.

5.1.2. Morfologia das nanosuspensões

O estudo morfológico das nanosuspensões do pinhão foi obtido utilizando a técnica de MEV- FEG à 25 °C, sendo possível observar os seus aspectos microscópicos e morfológicos (FIGURA 10), em três ampliações diferentes.

FIGURA 10 MORFOLOGIA DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO APÓS SÍNTESE EM MOINHO DE PEDRAS: PCN (A), WPN (B) E APN (C). AS IMAGENS FORAM OBTIDAS EM TRÊS AUMENTOS 500× (A), 500× (B), 2000× (C), 75000× (D*).



FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

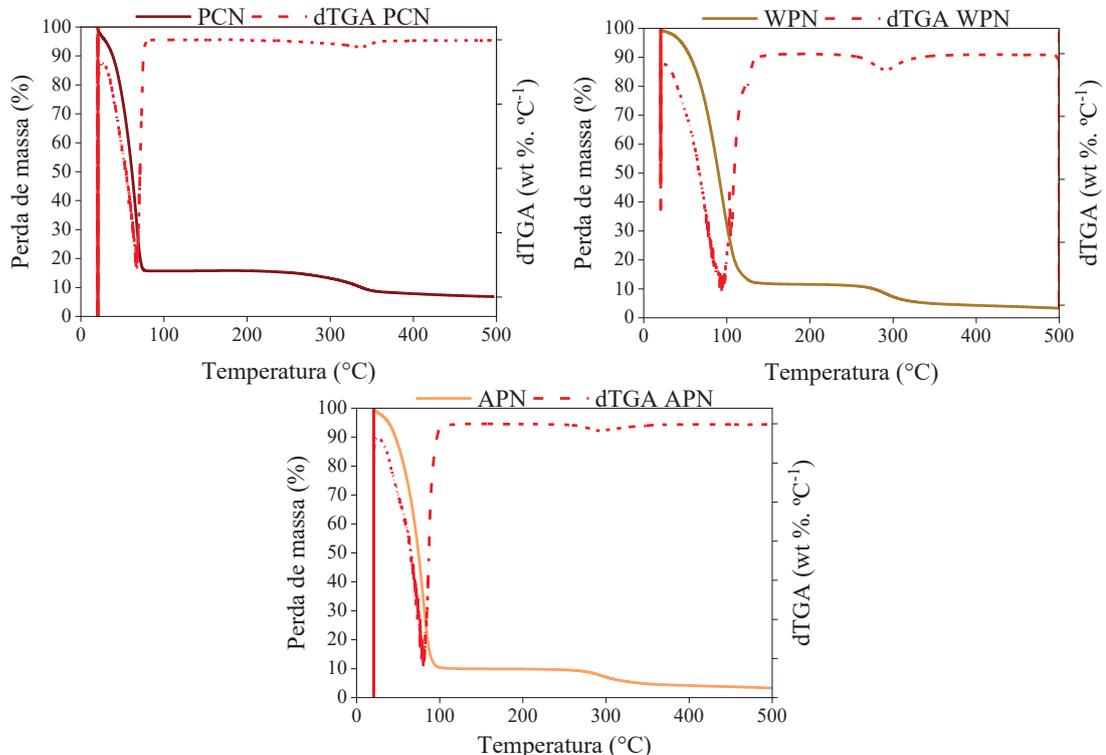
Com relação as imagens obtidas, para a amostra PCN verificou-se a presença de fibras de tamanho reduzido (FIGURA 10Ab e FIGURA 10Ac), o que também foi observado em trabalhos anteriores (LIMA *et al.*, 2020; TIMM *et al.*, 2020). Em contraste, na estrutura da amostra WPN não foi possível identificar a presença de fibras isoladas. Neste caso, o emprego do moinho de pedras foi responsável por originar uma nova estrutura resultante do processo de desfibrilação, devido a homogeneização das porções da casca e amêndoa do pinhão em um único componente, como pode ser observado nas FIGURA 10Bb e FIGURA 10Bc.

A estrutura da amostra APN (FIGURA 10C) demonstraram a presença de grânulos de amido do pinhão (FIGURA 10Ca e FIGURA 10Cb), sendo os principais componentes morfológicos da amostra APN. Os grânulos de amido encontrados na estrutura citada são semelhantes aos identificados em estudos prévios, sendo caracterizados por uma forma oval, hemisférica ou elipsóide truncada sem irregularidades (COSTA *et al.*, 2011; DAUDT *et al.*, 2014; HENRÍQUEZ *et al.*, 2008). No entanto, os grânulos de amido encontrados em APN apresentaram tamanho inferior (FIGURA 1Cd*) aos estudados anteriores, que apresentam tamanho entre 10 μm a 25 μm (ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017). Tal comportamento também pode estar relacionado ao emprego do moinho de pedras e com o processo de produção da nanosuspensão.

5.1.3. Perfil térmico das nanosuspensões

O perfil térmico das nanosuspensões do pinhão e seus constituintes foi obtido a partir da análise termogravimétrica (TGA) e sua primeira derivada (DTG), como pode ser observado na FIGURA 11.

FIGURA 11: PROPRIEDADES TÉRMICAS DE NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO AVALIADAS PELAS CURVAS (TGA) E DTG NA TAXA DE 10°C/min UTILIZANDO RAMPA DE TEMPERATURA DE 25 A 500 °C EM FLUXO DE NITROGÊNIO (50 mL/min).



FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

Para todas as amostras foi possível observar duas perdas mássicas principais que estão relacionados com a evaporação de água (primeira perda de massa) e a degradação de macromoléculas (segunda perda de massa), responsáveis por originar uma degradação acima de 90% das nanosuspensões de pinhão.

A principal perda de massa identificada na análise TGA ocorreu em torno de 69,8 – 94,2 °C, que pode ser correlacionada com a evaporação da água do material inicial (94 %). Além disso, a amostra PCN apresentou uma segunda perda de massa entre 290,9 – 337,1 °C, que pode ser associada à temperatura de degradação térmica (TDT) da fração de fibras totais, tais como celulose (TDT = 315 – 400 °C) e hemicelulose (TDT = 190 – 360 °C) (YANG *et al.*, 2007).

As amostras WPN e APN apresentaram uma segunda perda de massa semelhante a 300°C, devido a degradação do amido (TDT = 297 – 330°C) (LIU *et al.*,

2013). Apesar da amostra WPN apresentar a casca do pinhão como um de seus constituintes (ou seja, presença de fibras como celulose e hemicelulose), nenhum pico de degradação individual foi observado para as macromoléculas encontradas na casca do pinhão devido à alta concentração de amido e a semelhança das temperaturas de degradação entre as fibras relatadas e o amido, gerando um único pico de degradação próximo a 300°C.

Com relação as temperaturas de degradação térmica encontradas em fibras, como celulose, Pereira e colaboradores, 2021 avaliaram as propriedades das nanofibrilas a partir da coroa do abacaxi. Como resultado, observou-se que a degradação da celulose ocorreu entre 250 e 395°C, apresentando maior perda de massa entre 350 e 352°C. Já Bicudo e colaboradores (2009), realizaram a extração do amido presente na amêndoa do pinhão e avaliaram o perfil térmico do amido em solução aquosa. Os autores identificaram uma grande perda de massa próximo a 104°C, relacionado a desidratação da amostra. Em seguida os autores avaliaram a degradação do amido entre as temperaturas de 276 a 550°C. Como resultado, observou-se que a principal degradação ocorreu por volta de 310 °C, apresentando perda de massa de 70,5%.

Portanto, os dados experimentais obtidos através da análise termogravimétrica neste estudo apresentam semelhança com os dados obtidos na literatura, tal como as duas principais perdas de massa identificadas.

A técnica de DSC foi utilizada para verificar a presença de eventos térmicos nas nanosuspensões. Foram identificados eventos térmicos nas amostras WPN e APN, como pode ser observado na TABELA 4.

TABELA 4: TRANSIÇÃO TÉRMICA NA NANOSUSPENSÃO PROVENIENTE DO PINHÃO E SEUS CONSTITUÍNTES

Amostra	WPN**	APN
T _i *(°C)	48,65 ±0,20	50,07 ± 0,13
T _p (°C)	59,65 ±0,03	62,15 ± 0,21
T _c (°C)	75,95 ±0,41	76,57 ± 0,19
ΔH (J/g)	15,10 ±0,71	14,10 ±0,53

FONTE: O autor (2024).

Nota: * Temperatura de início (T_i), temperatura de pico (T_p) e a Temperatura de conclusão (T_c) do evento térmico encontrado nas nanosuspensões. **WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

Conforme TABELA 4, as amostras APN e WPN demonstraram um evento térmico próximo a 60 °C, sendo que o mesmo não foi observado na amostra PCN. Ao relacionar os dados obtidos na TABELA 4 com os dados da literatura, foi possível observar que o evento térmico em questão é a gelatinização do amido, o qual encontra-se presente na amêndoa do pinhão (DAUDT *et al.*, 2014; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017).

Com relação a temperatura de início (T_i), o pico (T_p) e a conclusão (T_c) do evento térmico encontrado nas nanosuspensões, verificou-se que a amostra APN apresentou maiores temperaturas frente as encontradas para WPN. Esse comportamento está relacionado a presença de fibras e a formação de uma nova morfologia na WPN, o que influenciou na temperatura de gelatinização do amido. Além disso, com relação aos valores de entalpia de transição térmica (ΔH) obtidos para ambos os eventos, foi possível observar que as amostras apresentaram valores distintos. A WPN apresentou valor de ΔH superior a APN.

Zortéa-Guidolin e colaboradores (2017) avaliaram a gelatinização do amido de pinhão aplicando diferente métodos de extração desse carboidrato. Como conclusão, os autores identificaram temperaturas de transição térmica entre 53,1- 71,0 °C e valores de entalpia de transição térmica entre 12,5-14,5 J/g. Já Daudt e colaboradores (2015), avaliaram a extração do amido de pinhão via precipitação utilizando água. Como resultado, os autores observaram que o evento da gelatinização teve início a 51,38 °C e conclusão em 61,02 °C, com valor de ΔH de 14,03 J/g.

Chipón e colaboradores (2022) avaliaram o comportamento térmico entre a mistura de celulose e amido ceroso, utilizando diversas concentrações de celulose. Como resultado, os autores observaram que o aumento da concentração de celulose, interferiu na temperatura de gelatinização, diminuindo a mesma. Em seguida, os autores avaliaram os valores de entalpia de transição térmica constatando que aumento da concentração de celulose, aumentou os valores de ΔH , até a concentração de 3%.

A faixa de temperatura encontrada pelos autores, bem como os valores de ΔH são semelhantes aos obtidos no presente trabalho. No entanto, os valores de entalpia de

transição térmica foram distintos quando comparadas as amostras APN e WPN. Esse comportamento se relaciona com a composição das nanosuspensões, principalmente com a quantidade de amido presente, bem como a presença do complexo lignocelulósico.

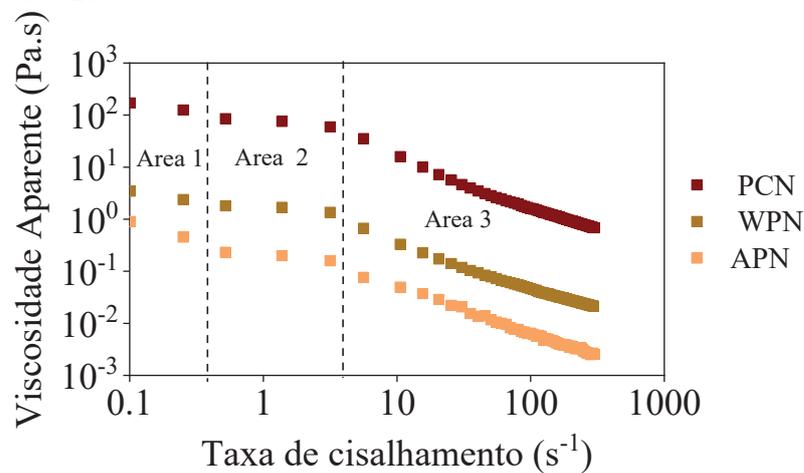
5.1.4. Comportamento reológico das nanosuspensões

O comportamento reológico das nanosuspensões foi avaliado através das análises de perfil de viscosidade, propriedades mecânicas e análise termomecânica das amostras.

5.1.4.1. Perfil de viscosidade

O perfil de viscosidade das nanosuspensões foi obtido através da variação da viscosidade das amostras em função da taxa de cisalhamento a 25 °C, conforme ilustrado na FIGURA 12.

FIGURA 12: PERFIL DE VISCOSIDADE DAS NANOSUSPENSÕES DO PINHÃO EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO A 25 °C.



FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

Com relação ao perfil de viscosidade das nanosuspensões (FIGURA 12), verificou-se que as amostras apresentam comportamentos distintos. Isso ocorre devido

as diferenças em suas composições, principalmente com relação ao teor de fibras totais. Conforme observado na TABELA 3, o aumento do teor de fibras totais na composição das nanosuspensões promoveu o aumento da viscosidade das amostras (PCN > WPN > APN). Esse comportamento está diretamente relacionado ao emprego do moinho de pedras, e conseqüente desfibrilação do complexo lignocelulósico da casca do pinhão contribuindo para a maior viscosidade das amostras PCN e WPN.

Além disso, de acordo com a FIGURA 12, observou-se que a amostra PCN sob baixa taxa de cisalhamento (Área 1) apresentou um leve decréscimo no perfil de viscosidade. Isso ocorreu devido à quebra inicial das ligações de hidrogênio formadas do entrelaçamento das nanofibrilas da casca do pinhão (PATOARY *et al.*, 2022). Um comportamento similar foi observado para a amostra WPN, conforme observado nas imagens de MEV-FEG (FIGURA 10Bb-Bc), constatou-se uma interação entre as nanofibrilas da casca do pinhão e os componentes de amêndoa, as quais são enfraquecidas com um ligeiro aumento da taxa de cisalhamento. No entanto, com o aumento ainda maior da taxa de cisalhamento (Área 2), ocorre a quebra e a formação simultânea de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals nas amostras PCN e WPN devido a homogeneização da amostra durante a análise, promovendo um leve decréscimo nos perfis de viscosidade de PCN e WPN. Por fim, sob uma alta taxa de cisalhamento (Área 3), uma queda substancial no perfil de viscosidade de PCN e WPN foi observado devido à quebra de grande parte das interações existentes nas amostras.

A amostra APN apresentou o menor perfil de viscosidade das amostras obtidas, como demonstrado na FIGURA 12, o que pode ser atribuído à ausência de fibras, bem como a limitada solubilidade em água dos compostos da amêndoa do pinhão a 25 °C. Em baixas taxas de cisalhamento (Área 1), as interações água-amido na amostra APN são ligeiramente quebradas, diminuindo os valores de viscosidade aparente. No entanto, o aumento da taxa de cisalhamento (Área 2), uma ligeira queda no perfil de viscosidade de APN ocorreu, possivelmente devido à ruptura parcial das ligações de hidrogênio formadas entre a água e o amido. Porém, sob alta taxa de cisalhamento (Área 3), a viscosidade aparente da amostra APN sofreu um grande decréscimo devido à quebra de

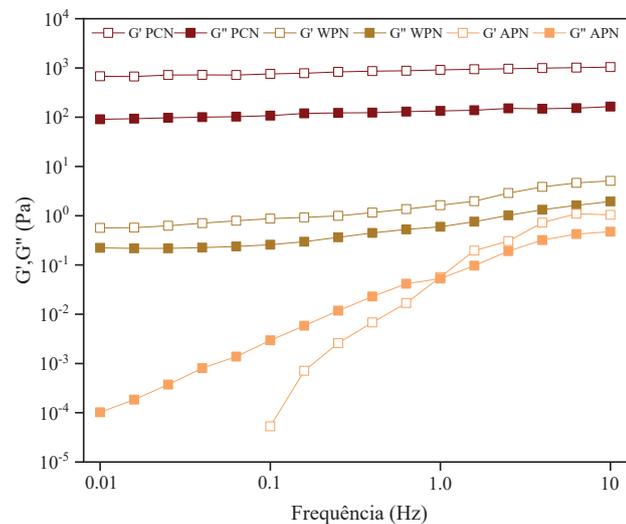
grande parte das interações entre a água e os constituintes da amêndoa do pinhão, bem como o processo de sinérese.

No geral, os perfis de viscosidade obtidos caracterizam as nanosuspensões como fluidos de comportamento pseudoplástico, identificado pela redução da viscosidade frente ao aumento da taxa de cisalhamento (SCHURZ, 1967).

5.1.4.2. Propriedades mecânicas das nanosuspensões

As propriedades mecânicas das nanosuspensões foram analisadas através da varredura de frequência oscilatória, avaliando o módulo de armazenamento ou módulo de cisalhamento sólido (G') e módulo de perda ou módulo líquido (G''), como pode ser observado na FIGURA 13.

FIGURA 13: PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO ATRAVÉS DO MÓDULO DE ARMAZENAMENTO (G' - SÍMBOLOS ABERTOS) E MÓDULO DE PERDA (G'' - SÍMBOLOS SÓLIDOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA A 25 °C. A FREQUÊNCIA FOI FIXADA NA FAIXA DE 0,01 Hz A 10 Hz COM UMA TENSÃO DE CISALHAMENTO DE 1 Pa.



FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

Em relação aos espectros mecânicos (FIGURA 13), a amostra PCN apresentou os maiores valores de G' e G'' , quando comparado as amostras WPN e APN, indicando

maior elasticidade e viscosidade frente as demais nanosuspensões. Além disso, os valores de G' e G'' dos espectros mecânicos da amostra PCN, podem ser correlacionados com o emprego do moinho de pedras em amostras que apresentam um alto teor de fibras totais (TABELA 3), criando uma estrutura tridimensional de nanofibrilas com a água, apresentando característica de gel fraco ($G' > G''$) e módulos independentes da frequência aplicada (PIRICH *et al.*, 2019).

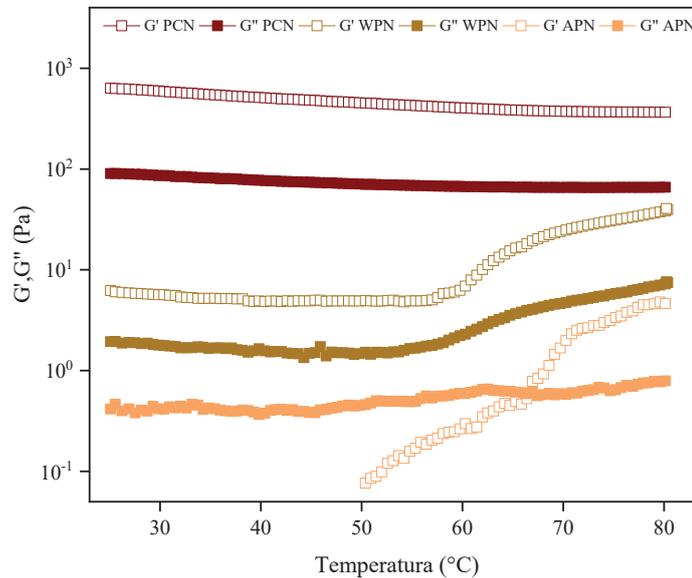
A amostra WPN apresentou comportamento semelhante a amostra PCN, sendo identificada a característica de gel fraco ($G' > G''$). No entanto, a amostra WPN apresentou dependência da frequência utilizada na análise, como pode ser observado com o aumento dos módulos G' e G'' durante a oscilação de frequência aplicada durante o experimento. Este comportamento está relacionado a presença de amido na amostra, contribuindo para valores de G' e G'' inferiores aos encontrados para a PCN. Ainda, a formação de uma nova estrutura morfológica, observada na FIGURA 10Ba-Bc, pode estar relacionada com a diminuição de interações entre a amostra WPN e a água, causando a redução da elasticidade e da viscosidade da amostra (CHIPÓN *et al.*, 2022).

A amostra APN mostrou dependência da frequência durante a análise, como pode ser observado no aumento dos valores de G' e G'' até 1Hz, devido à baixa solubilidade do amido em água, e a ocorrência de sinérese. Com o aumento da frequência (acima de 1 Hz), ocorre o cruzamento entre os módulos ($G' = G''$), o qual é característica do comportamento viscoelástico do tipo líquido. Além disso, o aumento dos módulos pode ser associado a uma maior interação entre as partículas e a água, responsável por aumentar a dissolução do amido em água, além de reduzir o processo de sinérese da nanosuspensão (CADEMARTORI *et al.*, 2019; CHIPÓN *et al.*, 2022).

5.1.4.3. Propriedades termomecânicas das nanosuspensões

As propriedades termomecânicas das nanosuspensões foram obtidas através do comportamento viscoelástico das amostras em função da temperatura, como ilustrado na FIGURA 14.

FIGURA 14: PROPRIEDADES TERMOMECÂNICAS DE NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO ATRAVÉS DO MÓDULO ELÁSTICO (G' - SÍMBOLOS ABERTOS) E MÓDULO VISCOZO (G'' - SÍMBOLOS SÓLIDOS) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. A FREQUÊNCIA FOI FIXADA EM 10 HZ COM UMA TENSÃO DE CISALHAMENTO DE 1 Pa, EMPREGANDO TAXA DE AQUECIMENTO DE 5 °C/MIN.



FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

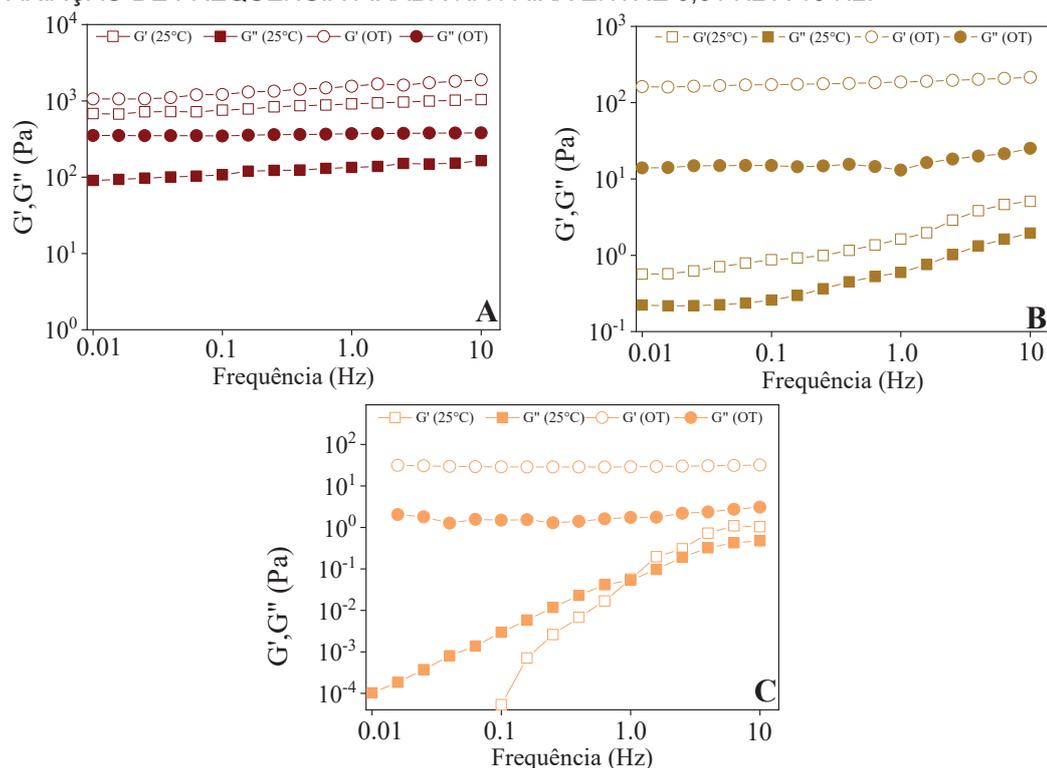
Com relação aos dados obtidos para a análise termomecânica (FIGURA 14), a amostra PCN apresentou valores de G' e G'' superiores a WPN e a APN. Esse comportamento mantém-se com o aumento da temperatura. Como consequência, a característica do gel ($G' > G''$) é mantida para esta nanosuspensão, o que foi observado em estudos disponíveis na literatura referente a nanosuspensões produzidas a partir de diferentes fontes, tais como celulose branqueada (PÄÄKKO *et al.*, 2007) e a casca de cacau (SOUZA *et al.*, 2019).

Os dados obtidos na análise termomecânica para a amostra WPN mostram que o aumento da temperatura (acima de 55 °C), modificou as propriedades viscoelásticas da amostra. Como consequência, observou-se que os valores de G' e G'' aumentaram. Analogamente, a amostra APN também apresentou aumento dos módulos G' e G'' , sendo observado com o aumento da temperatura acima de 50 °C, e cruzamento entre os módulos G' e G'' em 67 °C. Para as amostras WPN e APN, foi possível constatar uma melhora nas propriedades viscoelásticas, interligadas ao processo de gelatinização do

amido que modificou as propriedades da amostra. Como resultado uma alteração no comportamento dos módulos G' e G'' foi verificado. Ainda, foi possível observar a mesma tendência dos dados termomecânicos com os dados obtidos na análise térmica de DSC (TABELA 4).

Com a finalidade de verificar o comportamento das nanosuspensões após o aquecimento, as amostras submetidas a análise termomecânica foram resfriadas até 25 °C. Sequencialmente, seu comportamento mecânico foi verificado e comparado com as nanosuspensões iniciais (sem o processo de aquecimento), como ilustrado na FIGURA 15.

FIGURA 15: PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO (A-PCN, B-WPN E C-APN) ATRAVÉS DO MÓDULO ELÁSTICO (G' - SÍMBOLOS ABERTOS) E MÓDULO VISCOSO (G'' - SÍMBOLOS SÓLIDOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA ANTES DO PROCESSO DE AQUECIMENTO E APÓS VARREDURA DE OSCILAÇÃO DE TEMPERATURA (OT). A TENSÃO DE CISLHAMENTO DE 1 Pa, E VARIAÇÃO DE FREQUÊNCIA FIXADA NA FAIXA ENTRE 0,01 Hz A 10 Hz.



FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

O aquecimento das nanosuspensões resultou no aumento dos módulos G' e G'' em comparação com a temperatura ambiente (FIGURA 15). Em relação a amostra PCN (FIGURA 15A), os módulos G' e G'' exibiram um aumento moderado após a análise termomecânica, mantendo a característica de gel ($G' > G''$). A pequena variação entre os valores entre G' e G'' encontrada, pode estar relacionada à evaporação da água presente na nanosuspensão.

Além disso, como relatado anteriormente, o processo de gelatinização do amido ocorre com o aumento da temperatura, responsável pela ruptura celular dos grânulos de amido e pela modificação das propriedades viscoelásticas da WPN e da APN. Como esperado, os valores de G' e G'' aumentaram de forma irreversível com a oscilação da temperatura para as amostras em questão (FIGURA 15B e FIGURA 15C), apresentando característica de gel ($G' > G''$), independente da frequência aplicada na análise.

5.1.5. Perfil cromatográfico das nanosuspensões obtido via CG-MS

A identificação dos compostos presentes nas nanosuspensões foi realizada utilizando CG-MS. Os compostos foram divididos em duas classes principais, sendo elas a classe hidrofílica e lipofílica. Deste modo, foram identificadas cinco classes diferentes (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, fenóis e ciclitóis) pertencentes aos hidrofílicos (TABELA 5). Já os compostos lipofílicos, foram identificados e separados em seis diferentes classes (ácidos carboxílicos, diterpenos, álcoois, A- hidroxíácidos, esteróis e triterpenos), como demonstrado na TABELA 6.

TABELA 5: COMPOSTOS HIDROFÍLICOS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO.

RI	Composto	Classe	m/z			PCN* (µg/g)	WPN (µg/g)	APN (µg/g)
			(1)	(2)	(3)			
1352,4	Alanina	Aminoácido	290	262	188	2,60 ± 0,27	2,81 ± 0,04	3,20 ± 0,08
1481,5	Ácido málico	Ácido orgânico	335	245	233	16,62 ± 1,22	3,59 ± 0,19	0,14 ± 0,03
1522,8	Prolina	Aminoácido	332	230	140	0,55 ± 0,12	9,96 ± 0,20	13,59 ± 0,67
1548,8	Fenilalanina	Aminoácido	266	218	192	1,52 ± 0,08	2,46 ± 0,03	2,87 ± 0,02
1624,3	Ácido 4-Hydroxy-benzoico	Fenol	282	267	223	22,67 ± 0,09	8,61 ± 0,07	2,60 ± 0,01
1656,0	Arabinose	Açúcar	307	277	217	5,79 ± 0,05	193,60 ± 0,94	274,13 ± 1,64
1813,6	Ácido Protocatecúico	Fenol	370	355	193	88,50 ± 0,07	31,75 ± 0,04	7,43 ± 0,27
1820,1	D-pinitol	Ciclitol	318	260	217	242,98 ± 2,67	204,60 ± 3,74	189,50 ± 2,08
1849,6	Ácido Quínico	Ácido orgânico	372	345	255	665,17 ± 3,07	203,70 ± 4,04	5,77 ± 0,48
1862,0	Frutose	Açúcar	364	307	217	160,20 ± 3,07	19,812,81 ± 4,04	28.232,33 ± 2,38
1905,2	Glucose	Açúcar	319	217	205	120,50 ± 1,77	15,740,05 ± 5,94	22.450,48 ± 9,68
1923,1	Sorbitol	Açúcar	421	319	217	150,88 ± 3,97	646,01 ± 0,12	861,62 ± 0,27
1948,7	Ácido gálico	Fenol	458	443	281	64,36 ± 0,26	19,60 ± 0,07	0,57 ± 0,01
1952,2	Ononitol	Ciclitol	318	260	217	69,97 ± 0,82	59,06 ± 0,23	54,42 ± 0,57
2081,2	Myo-inositol	Ciclitol	318	305	217	216,08 ± 4,07	358,62 ± 0,11	423,39 ± 0,28
2091,5	Ácido ferrúlico -T	Fenol	338	323	308	16,28 ± 0,17	4,71 ± 0,17	Nd
2624,9	Sucrose	Sugar	437	361	217	137,71 ± 3,67	925,76 ± 2,41	1.155,28 ± 1,56
2856,1	Epi-catequina	Fenol	650	368	355	29,87 ± 1,07	9,62 ± 0,19	1,33 ± 0,24
2868,7	Catequina	Fenol	650	368	355	1.806,18 ± 1,87	548,65 ± 1,69	3,26 ± 0,32
2412	Epi-galocatequina	Fenol	648	456	355	30,80 ± 0,24	9,95 ± 0,53	0,93 ± 0,12
2919,9	Galocatequina	Fenol	648	456	355	11,16 ± 0,83	3,64 ± 0,32	0,62 ± 0,13
3160,9	Quercetina	Fenol	647	559	487	179,60 ± 0,98	51,34 ± 0,78	0,18 ± 0,01

FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

A fração hidrofílica é composta majoritariamente por açúcares e compostos fenólicos, como observado na TABELA 5. Observou-se que as amostras APN e WPN demonstraram elevado teor de glucose e frutose (acima de 30.000 µg/g). Com relação a ingestão de açúcares, sabe-se que o consumo de açúcares tais como, frutose e glicose, em quantidade regular, é uma fonte de energia para o organismo. Além disso, o consumo de açúcares causa a liberação do hormônio dopamina, responsável pela sensação de recompensa e prazer (QI; TESTER, 2019).

De acordo com a TABELA 5, os compostos fenólicos foram a segunda classe de metabólitos mais encontradas nas nanosuspensões, sendo a catequina o composto fenólico predominante nas amostras PCN ($1.806,18 \pm 1,87$ µg/g) e WPN ($548,65 \pm 1,69$ µg/g). Em contrapartida, o ácido protocatecúico foi o principal fenol encontrado na amostra APN ($7,43 \pm 0,27$ µg/g). Com relação aos benefícios interligados à presença de catequina e seus isômeros, é válido ressaltar a atividade antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana desses compostos bioativos (SUGANUMA *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2022). Além disso, testes *in vitro* demonstraram o efeito anti-inflamatório da catequina e seus isômeros em doenças de pele, tais como dermatites (NAKANO *et al.*, 2019). Além disso, os benefícios do ácido protocatecúico estão interligados com efeitos anti-inflamatórios e perda de peso (ZHANG; GONZALEZ DE MEJIA, 2020), bem como ação antidiabética (PUGALENDI, 2010).

Além dos compostos anteriormente relatados, ciclitóis, como Myo-inositol, D-pinitol e onotonitol também foram identificados nas nanosuspensões. Os benefícios Myo-inositol está relacionado a prevenção do diabetes gestacional (LI; FANG, 2022), enquanto que o D-pinitol melhora o transporte de glucose e a sensibilidade à insulina no organismo humano (MOLONIA *et al.*, 2021). Por fim, estudos identificaram que o onotonitol apresenta um efeito hepatoprotetor no organismo humano (DHANASEKARAN *et al.*, 2009).

Por fim, também foram identificados aminoácidos essenciais (alanina, prolina e fenilalanina) principalmente nas amostras APN e WPN. Essa classe de compostos está diretamente relacionada com a regeneração tecidual e celular, produção de anticorpos e células vermelhas no sangue humano (XIAO; GUO, 2022).

Lima e colaboradores (2020) avaliaram o perfil cromatográfico da nanosuspensão da casca do pinhão, à uma concentração de 6% (m/m). Como resultado, os autores verificaram a presença de compostos similares aos do presente trabalho, tais como compostos fenólicos (catequina, ácido gálico e quercetina) e açúcares (frutose e glucose). Em comparação com os dados obtidos para PCN, foi possível observar que a amostra estudada pelos autores apresentou teor inferior de catequina (254,51 µg/g), ácido gálico (19,78 µg/g) e quercetina (70,24 µg/g). Além disso, a nanosuspensão avaliada pelos autores apresentaram menor teor de frutose (0,63 µg/g) e glucose (16,69 µg/g) (LIMA *et al.*, 2020).

TABELA 6: COMPOSTOS LIPOFÍLICOS DAS NANOSUSPENSÕES DE PINHÃO.

RI	Composto	Classe	m/z	m/z	m/z	PCN* (µg/g)	WPN (µg/g)	APN (µg/g)
			(1)	(2)	(3)			
1724,3	Ácido Tetradecanoico (Ácido Mirístico)	Ácido Carboxílico	242	199	143	176,94 ± 0,78	346,2 ± 1,08	419,04 ± 0,99
2018,6	Ácido Heptadecanoico (Ácido Margárico)	Ácido Carboxílico	284	199	143	101,66 ± 1,86	126,3 ± 0,14	138,53 ± 0,10
2094,7	Ácido 9.12-(Z,Z)-octadecadienoico (Ácido Linoleico)	Ácido Carboxílico	294	262	220	630,99 ± 0,21	369,46 ± 0,13	257,82 ± 0,98
2101,7	Ácido 9-(Z)-octadecenoico (Ácido Oleico)	Ácido Carboxílico	296	264	222	418,69 ± 0,61	1.007,34 ± 1,78	1.273,22 ± 4,01
2272,7	Ácido X.y.z-eicosatrienoico (Ácido α-Linolenico)	Ácido Carboxílico	335	121	91	106,52 ± 2,98	410,34 ± 0,15	552,89 ± 0,66
2328,2	Ácido Eicosanoico (Ácido Araquídico)	Ácido Carboxílico	326	199	143	137,18 ± 2,38	1.140,34 ± 2,78	1.734,91 ± 0,14
2345,7	Ácido Dehidroabiético	Diterpeno	314	299	239	44,99 ± 0,73	14,12 ± 0,38	Nd
2530,0	Ácido Docosanoico (Ácido Behênico)	Ácido Carboxílico	354	199	143	256,04 ± 5,13	1.029,21 ± 3,68	1.417,18 ± 4,39
2730,6	Ácido Tetracosanoico (Ácido Lignocérico)	Ácido Carboxílico	382	199	143	589,54 ± 3,22	301,11 ± 0,16	225,57 ± 1,91
2804,6	Ácido 2 – hidroxitricosanoico	Hidróxido-Ácido	441	397	159	274,88 ± 0,59	80,12 ± 0,96	Nd
2832,5	Ácido Pentacosanoico (Ácido Hiênico)	Ácido Carboxílico	396	199	143	69,31 ± 0,30	19,01 ± 1,01	Nd
2873,6	8 – heptacosanol	Álcool	453	369	201	64,23 ± 1,13	119,01 ± 1,23	148,40 ± 0,37
2904,1	Ácido 2-hidroxitetraacosanoico	Hidróxido-Ácido	455	411	159	1.396,04 ± 0,13	406,21 ± 2,01	Nd
2932,3	Ácido Hexacosanoico (Ácido Cerótico)	Ácido Carboxílico	410	199	143	223,65 ± 0,24	129,11 ± 0,92	82,90 ± 0,29
2939,6	Hexacosanol	Álcool	439	111	97	56,22 ± 0,91	13,19 ± 1,01	Nd
2999,1	Ácido 2 – hidroxipentacosanoico	Hidróxido-Ácido	469	425	159	472,53 ± 1,44	117,06 ± 1,56	Nd
3091,9	Ácido 2 – hidroxihexacosanoico	Hidróxido-Ácido	483	439	159	299,15 ± 0,23	87,11 ± 0,37	Nd
3230,9	Campesterol	Esteroil	472	382	343	684,39 ± 0,37	389,82 ± 1,12	301,76 ± 1,51
3312,8	β-sitosterol	Esteroil	486	396	357	6.607,54 ± 2,73	2.628,73 ± 1,10	1.005,95 ± 0,16
3401,5	β- Amirin Metil- Eter	Triterpeno	218	203	199	282,22 ± 1,13	209,17 ± 1,52	132,57 ± 2,06

FONTE: O autor (2024).

*PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

Com relação aos compostos lipofílicos (TABELA 6), foi possível observar que os esteróis foram o principal grupo de compostos detectados nas nanosuspensões de pinhão, sendo o β -sitosterol o principal bioativo presente na PCN ($6.607,54 \pm 2,73 \mu\text{g/g}$), WPN ($2.628,73 \pm 1,10 \mu\text{g/g}$) e na APN ($1.005,95 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$). Dentre os principais benefícios da ingestão dos esteróis, é importante ressaltar a redução do nível de colesterol no sangue e o potencial anti-inflamatório e anticancerígeno deste composto (AYAZ *et al.*, 2019; GARCIA-LLATAS *et al.*, 2021; GHAEDI *et al.*, 2020; HANNAN *et al.*, 2020).

Além disso, outra classe amplamente encontrada nas amostras foram os ácidos carboxílicos. Dentre os principais ácidos identificados, o ácido linoleico foi quantificado em maiores concentrações na amostra PCN ($630,99 \pm 0,21 \mu\text{g/g}$), enquanto o ácido eicosanóico foi o principal detectado nas WPN ($1.140,34 \pm 2,78 \mu\text{g/g}$) e APN ($1.734,91 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$). Além do mais, também foi identificada a presença de ácidos graxos essenciais nas nanosuspensões de pinhão, como ácido oleico (18:1n-9), ácido linoleico (18:2n-6) e o ácido α -linolênico (18:3n-3). A ingestão de ácidos graxos essenciais é de grande importância para o organismo humano, uma vez que está interligada com a síntese de ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) no metabolismo. O consumo da série ômega está diretamente relacionado a prevenção de distúrbios neurológicos, redução do colesterol no sangue e, conseqüentemente, a prevenção de doenças cardiovasculares (DJURICIC; CALDER, 2021; LUO *et al.*, 2018).

Os terpenos também foram identificados nas nanosuspensões a partir do pinhão e seus constituintes. Essa classe de compostos é produzida por coníferas, e são detectados em subprodutos madeiráveis, como observou-se em maior quantidade nas amostras PCN ($327,21 \mu\text{g/g}$) e WPN ($223,29 \mu\text{g/g}$), quando comparada a amostra APN ($132,57 \mu\text{g/g}$). Com relação aos benefícios da ingestão dos terpenos, é importante ressaltar seus efeitos anti-inflamatórios (CHO *et al.*, 2017) e inibidores das enzimas α -amilase e α -glucosidase, demonstrando grande potencial no tratamento do diabetes *mellitus* (SHAH *et al.*, 2021).

Lima e colaboradores (2020) avaliaram a presença de compostos lipofílicos na nanosuspensão da casca do pinhão, verificando a presença de compostos similares aos

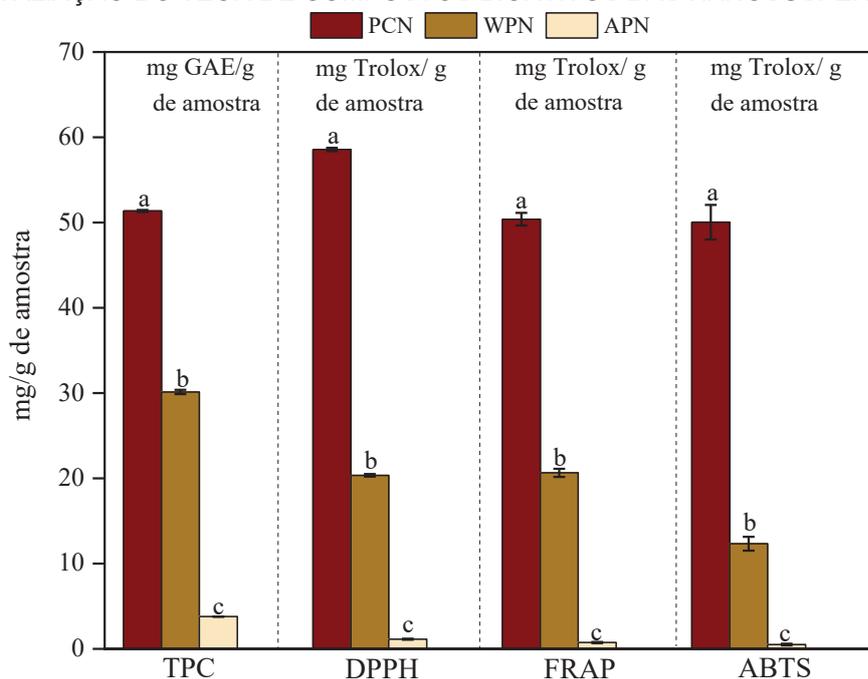
do presente trabalho na amostra PCN. Dentre os compostos encontrados, destacam-se os ácidos carboxílicos (oleico, araquídico, linoleico e behênico), hidróxi-ácidos (2-hidroxitetracosanóico, 2-hidroxipentacosanóico e 2-hidroxi-hexacosanóico) e esteróis (Campesterol e β -sitosterol). Em comparação com os dados obtidos no presente trabalho (TABELA 6), os autores identificaram teores inferiores de ácido oleico (189,09 $\mu\text{g/g}$), linoleico (69,66 $\mu\text{g/g}$), araquídico (53,37 $\mu\text{g/g}$) e behênico (56,19 $\mu\text{g/g}$). Além disso, segundo os mesmos autores, a quantidade de compostos da classe dos hidróxi-ácidos, como observado para o Ácido 2-hidroxitetracosanóico (110,32 $\mu\text{g/g}$), 2-hidroxipentacosanóico (43,79 $\mu\text{g/g}$) e 2-hidroxi-hexacosanóico (14,86 $\mu\text{g/g}$) também foram inferiores frente aos encontrados no presente trabalho. Por fim, os mesmos autores identificaram a presença de esteróis na suspensão da casca do pinhão, sendo encontrados valores inferiores para o Campesterol (68,78 $\mu\text{g/g}$) e para o β -sitosterol (449,72 $\mu\text{g/g}$).

As variações encontradas no teor de compostos presentes na nanosuspensão da casca do pinhão podem estar relacionadas a época de colheita do pinhão, tal como seu grau de maturação. Além disso, o processo de síntese da nanosuspensão também influencia no teor de compostos bioativos identificados, uma vez que foram utilizados diferentes parâmetros de síntese, tais como preparo de amostra, bem como número de passes e ajuste das pedras do moinho.

5.1.6. Avaliação da atividade antioxidante das nanosuspensões

A atividade antioxidante das nanosuspensões foi avaliada empregando análises colorimétricas *in vitro*, sendo elas DPPH e ABTS, baseadas na captura de radical livre, redução do íon ferro (FRAP) e capacidade redutora de fenóis totais (TPC). Os resultados foram expressos em mg/g de amostra (FIGURA 16).

FIGURA 16. AVALIAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS DAS NANOSUSPENSÕES.



FONTE: O autor (2024).

* Nota: Letras diferentes em um mesmo grupo de colunas apresentam diferença significativa entre si (ANOVA, Tukey LSD; $p < 0,05$). **PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

A atividade antioxidante das nanosuspensões (FIGURA 16) está presente, em quase toda a sua totalidade, na casca do pinhão. Como dito nos tópicos anteriores, este subproduto é rico em compostos bioativos, como a classe fenólica (catequina e seus isômeros, quercetina e ácido gálico), assim como observado na TABELA 6. A amêndoa, por sua vez, apresenta baixo teor de compostos bioativos, como relatado anteriormente por diversos autores (CORDENUNSI *et al.*, 2004; KOEHNLEIN *et al.*, 2012). A atividade antioxidante da amostra WPN foi inferior em relação ao PCN devido ao maior teor de amêndoa frente a casca do pinhão, contribuindo para a diminuição da atividade antioxidante.

Com relação aos trabalhos de extração de bioativos provenientes do pinhão e seus constituintes empregando solventes convencionais para sua extração, Cordenunsi e colaboradores, (2004) analisaram o teor de compostos fenólicos totais, expressos em termos de catequina equivalente por grama de amostra (mg_{CE}/g de amostra),

apresentando um valor de $3,21 \pm 0,17$ mg_{CE}/g de amostra para a amêndoa com a presença da casca interna. Com a remoção do revestimento, para a amêndoa *in natura* ($0,23 \pm 0,01$ mg_{CE}/g de amostra) e amêndoa cozida ($0,11 \pm 0,01$ mg_{CE}/g de amostra).

Sant'Anna e colaboradores, (2016) realizaram a quantificação de biocompostos presentes na casca do pinhão sem cocção e na casca do pinhão submetida ao processo de cocção em diferentes tempos de estocagem. O teor de compostos fenólicos totais, em miligramas de ácido gálico equivalente por grama (mg_{GAE}/g) aumentou no resíduo submetido ao cozimento de $25,03 \pm 1,05$ mg_{GAE}/g para $51,37 \pm 2,82$ mg_{GAE}/g. Os dados obtidos das nanosuspensões provenientes da casca do pinhão ($51,35 \pm 0,12$ (mg_{GAE}/g)) são semelhantes a condição pós cozimento, uma vez que a síntese da suspensão necessitou de menos tempo e temperatura de processo.

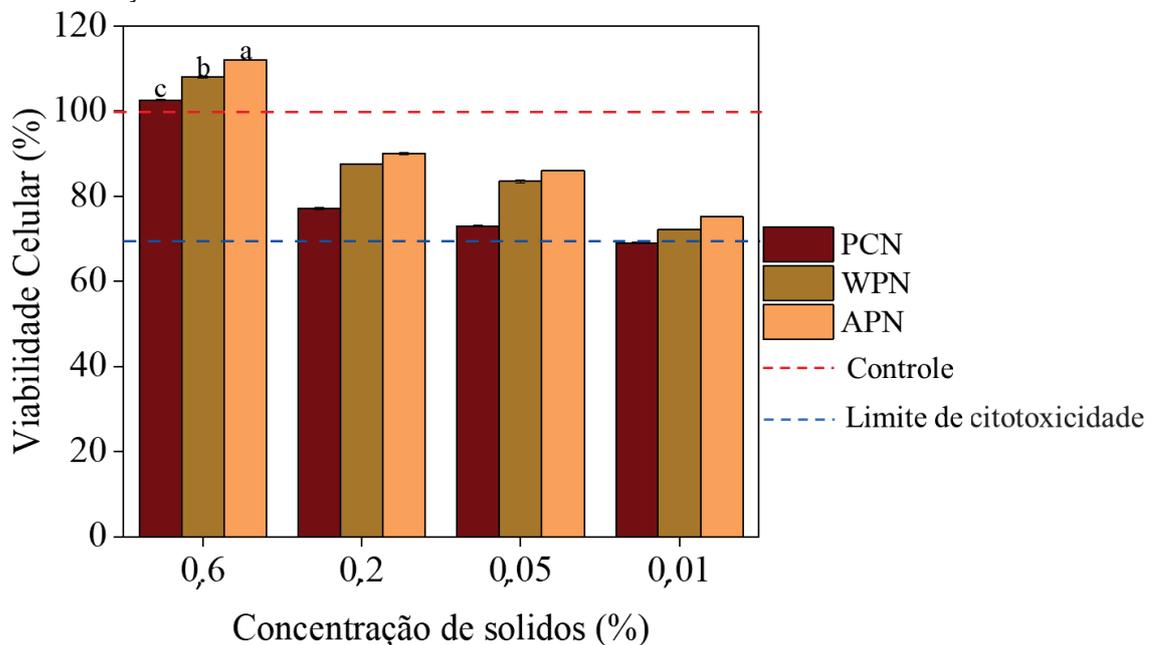
De Freitas e colaboradores (2018), avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos alcoólicos, hidroalcoólicos e a água de cozimento do pinhão, empregando as metodologias de DPPH, FRAP e ABTS. Os resultados para a atividade antioxidante empregando metodologia DPPH não apresentaram diferença significativa para nenhum dos extratos avaliados, sendo observado valores na ordem de $2,465 \pm 0,13$ mg_{Trolox}/g_{casca}. Em relação à análise de FRAP, foi possível observar um maior valor para o extrato hidroalcoólico ($2,07 \pm 0,26$ mg_{Trolox}/g_{casca}). Em relação aos resultados da análise ABTS foi possível observar um valor superior para a água de cozimento do pinhão ($13,68 \pm 2,49$ mg_{Trolox}/g_{casca}), quando compara ao extrato hidroalcoólico ($12,29 \pm 1,01$ mg_{Trolox}/g_{casca}) e extrato alcoólico ($6,60 \pm 0,45$ mg_{Trolox}/g_{casca}).

Os dados obtidos de atividade antioxidante da suspensão proveniente da casca do pinhão apresentaram maior atividade antioxidante mensurada pelo FRAP ($50,39 \pm 0,73$ mg_{Trolox}/g_{casca}), ABTS ($50,04 \pm 2,03$ mg_{Trolox}/g_{casca}) e DPPH ($58,56 \pm 0,18$ mg_{Trolox}/g_{casca}) frente a todos os extratos obtidos pelos autores. Isso ocorre devido ao processo de moagem do moinho de pedras, o qual aumenta o rendimento de extração de compostos bioativos devido à redução do tamanho das partículas, promovendo melhoria na transferência de massa. Além disso, o emprego da tecnologia do moinho de pedras é um procedimento que utiliza baixa temperatura, sintetizando amostras que podem ser utilizadas como aditivos sem separação sólido-líquido, reduzindo a geração de resíduos.

5.1.7. Avaliação do potencial citotóxico das nanosuspensões em células 3T3

O potencial citotóxico das nanosuspensões provenientes do pinhão e seus constituintes foi avaliado empregando o teste de viabilidade celular em células de fibroblastos de camundongos (NIH-3T3), como ilustrado na FIGURA 17.

FIGURA 17: VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGOS APÓS EXPOSIÇÃO NAS NANOSUSPENSÕES PROVENIENTES DO PINHÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



FONTE: O autor (2024).

* Nota: *Letras diferentes em um mesmo grupo de colunas apresentam diferença significativa entre si e são superiores significativamente ao controle (ANOVA, Tukey LSD; $p < 0,05$). *PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão), WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral) e APN (Nanosuspensão da Amêndoa do Pinhão).

Conforme observado na FIGURA 17, a citotoxicidade de APN, WPN e PCN foi avaliada em células de fibroblastos de ratos (NIH 3T3) e comparadas com o controle (100% de viabilidade celular), representado pela linha tracejada vermelha. Como resultado, observou-se que todas as concentrações de sólidos testadas estavam acima do limite citotóxico (linha tracejada azul) (ou seja, viabilidade celular $\geq 70\%$), não apresentando toxicidade às células NIH 3T3 (ALIABADI *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2022). Além disso, para uma maior concentração de sólidos (0,6 %), as nanosuspensões

promoveram proliferação celular, como verificado para a APN ($112,21 \pm 0,14$ %), WPN ($108,13 \pm 0,22$ %) e PCN ($102,53 \pm 0,22$ %), uma vez que a viabilidade celular encontrada foi superior ao controle ($>100\%$).

A viabilidade celular encontrada para a APN e a WPN está relacionada com o elevado teor de açúcar presente nas amostras, como pode ser observado na TABELA 5. Isto ocorre por conta da utilização do meio DMEM, de baixa concentração de glicose, fazendo com que as células na presença de uma maior concentração de açúcares, demonstrem crescimento e desenvolvimento (RYU *et al.*, 2020; TORRES *et al.*, 2011). Assim, constatou-se que as células 3T3 apresentaram alta biocompatibilidade com a APN e a WPN, ocasionando a proliferação celular.

A viabilidade celular encontrada para a PCN está interligada à presença de compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos, os quais atuam na proteção celular contra a oxidação. A presença desses compostos foi extensivamente avaliada em células 3T3, e em todos os casos, a sua presença promoveu o aumento da viabilidade celular (BAYRAMI *et al.*, 2018; ZAIN *et al.*, 2020). Na literatura, Lima e colaboradores (2022) avaliaram o potencial citotóxico de filmes provenientes da nanosuspensão da casca do pinhão, sendo avaliada a viabilidade celular em células NIH-3T3 e Schwann. Como resultado, os autores verificaram que o acréscimo de filme na análise, aumentou a viabilidade celular de ambas as culturas utilizadas.

Em geral, as nanosuspensões provenientes do pinhão e seus constituintes apresentaram alta viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas, não demonstrando citotoxicidade na linhagem avaliada. Entretanto, outros ensaios de viabilidade devem ser realizados, a fim de garantir estes resultados.

5.2. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO COMO ADITIVOS EM CREMES FACIAIS²

5.2.1. Obtenção das amostras

A PCN foi adicionada na formulação de creme facial, nas concentrações pré-selecionadas (TABELA 1), sendo possível obter as amostras ilustradas na FIGURA 18.

FIGURA 18: ASPECTO VISUAL DAS FORMULAÇÕES OBTIDAS APÓS A ADIÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DA CASCA DO PINHÃO COM A FORMULAÇÃO CONTROLE.



FONTE: O autor (2024).

*As amostras F1, F2, F3 e F4 contêm respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% de PCN (Nanosuspensão da Casca do Pinhão) em massa na formulação.

A formulação controle (ou seja, sem adição de PCN) apresentou aspecto leitoso de cor clara, enquanto as formulações com presença de PCN apresentaram coloração leitosa marrom claro, como demonstrado na FIGURA 18. Além disso, o aumento da concentração de PCN nas formulações da loção foi responsável pela intensificação da sua tonalidade marrom. Em relação ao odor das loções base PCN, não foi observado cheiro distinguível entre a formulação com ou sem PCN, apresentando de forma geral uma fragrância agradável.

Com relação a adição da nanosuspensão da casca do pinhão foi possível observar que, após homogeneização, não houve formação de duas fases. Além disso, foi realizado o teste de estabilidade primária das formulações incorporadas, sendo

² Esta seção encontra-se publicada na revista *Waste and Biomass Valorization*, intitulada "Pinhão coat (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) nanosuspension as a potential additive in cosmetic formulations with wound healing effect".

constatado que após a centrifugação não houve separação de fases, bem como aparecimento de pontos isolados na formulação contendo a amostra incorporada.

5.2.2. Caracterização das formulações obtidas a partir da adição da nanosuspensão da casca do pinhão

Os cremes obtidos a partir da adição de nanosuspensão da casca do pinhão foram inicialmente caracterizados, quanto aos parâmetros de cor, pH e espalhabilidade, como descrito na TABELA 7.

TABELA 7: AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES NOS PARÂMETROS DE pH, ESPALHABILIDADE E COR.

Amostra	pH	Espalhabilidade (cm ²)	L	Cor		ΔE
				a	b	
Controle	4,69 ± 0,15 ^{a*}	33,29 ± 0,07 ^c	85,94 ± 0,02 ^a	-1,10 ± 0,01 ^e	-0,27 ± 0,02 ^e	-
F1**	4,59 ± 0,02 ^b	33,44 ± 0,02 ^b	85,30 ± 0,04 ^b	-0,42 ± 0,01 ^c	1,85 ± 0,07 ^c	2,17 ± 0,38 ^c
F2	4,55 ± 0,03 ^{b,c}	33,50 ± 0,04 ^b	84,43 ± 0,02 ^c	-0,25 ± 0,01 ^d	1,61 ± 0,47 ^d	2,68 ± 0,07 ^c
F3	4,49 ± 0,03 ^{c,d}	33,58 ± 0,05 ^{a,b}	83,30 ± 0,08 ^d	0,39 ± 0,01 ^b	3,56 ± 0,01 ^b	4,88 ± 0,06 ^b
F4	4,42 ± 0,01 ^d	33,66 ± 0,01 ^a	79,63 ± 0,01 ^e	1,27 ± 0,02 ^a	5,03 ± 0,02 ^a	8,57 ± 0,07 ^a

FONTE: O autor (2024).

* Nota: *Letras diferentes em um mesmo grupo de colunas demonstram diferença significativa entre si (ANOVA, Tukey LSD; p<0,05). **As amostras F1, F2, F3 e F4 contém respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% em massa de PCN na formulação.

As propriedades obtidas das formulações a partir da incorporação da nanosuspensão da casca do pinhão (TABELA 7) demonstraram que o aumento da concentração da nanosuspensão, ocasionou abaixamento do pH da formulação. Assim, foi possível observar que a formulação F4 apresentou os mais baixos valores de pH (4,42 ± 0,01), quando comparados com a formulação controle (4,69 ± 0,15). Esse comportamento está relacionado com a presença de compostos de caráter ácido na casca do pinhão, tais como os compostos fenólicos, os quais abaixam o pH do meio (PERALTA *et al.*, 2016). Contudo, os resultados de pH das formulações avaliadas estão de acordo com normas padrões vigentes, uma vez que são recomendados valores de

pH na faixa de 4-6, prevenindo alergias e irritações a pele humana (ALI; YOSIPOVITCH, 2013)

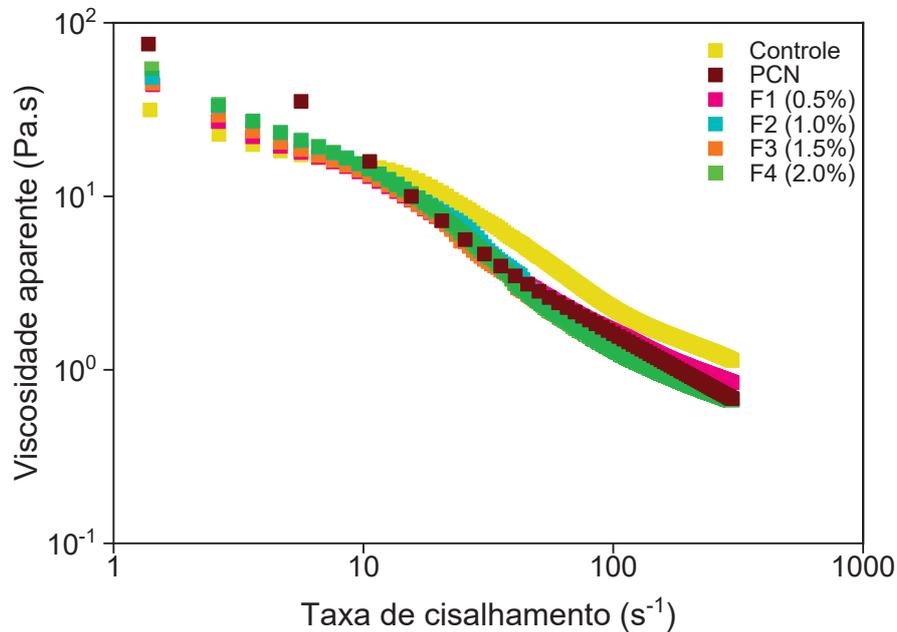
A espalhabilidade dos cremes é a capacidade de uma formulação em se espalhar, frente a aplicação de uma determinada força. Assim, quanto maior o valor de espalhabilidade obtido do cosmético, maior a sua facilidade de aplicação (CHU; NYAM, 2020). De tal forma, observou-se que a adição de PCN à formulação, aumentou significativamente a espalhabilidade das amostras avaliadas, como observado principalmente na amostra F4 ($33,66 \pm 0,01 \text{ cm}^2$) quando comparada com a amostra controle ($33,29 \pm 0,07 \text{ cm}^2$).

Além disso, também foi avaliada a cor das formulações, visto que é um parâmetro industrial bem importante, devido à dificuldade de padronização e aceitabilidade dos produtos. Na literatura, alguns autores avaliam que a coloração passa a ser visualmente perceptível, uma vez que os valores de variação total de cor (ΔE) são superiores a 2 (SIM; NYAM, 2021; ZHOU *et al.*, 2009). Verificou-se que houve alteração de cor perceptível nas formulações que foram incorporadas com mais de 1% da PCN.

5.2.3. Avaliação das propriedades reológicas das formulações

As formulações obtidas foram avaliadas quanto às suas viscosidades através da obtenção das curvas de fluxo em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme ilustrado na FIGURA 19.

FIGURA 19: PERFIL DE VISCOSIDADE APARENTE (Pa.s) DA PCN, LOÇÃO CONTROLE E FORMULAÇÕES OBTIDAS EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO (s^{-1}) A 25 °C.



FONTE: O autor (2024).

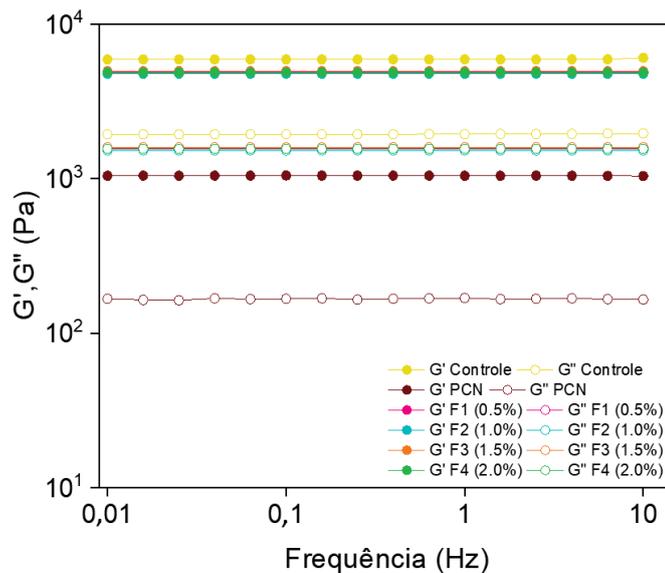
*As amostras F1, F2, F3 e F4 contém respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% em massa de PCN na formulação.

**PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão com 6% de sólidos totais).

De acordo com a FIGURA 19, o aumento da concentração de PCN resultou em uma alteração no perfil de viscosidade aparente das formulações em comparação ao controle. Este resultado pode estar relacionado ao alto teor de água e à morfologia do PCN, que foi responsável por modificar o comportamento viscoelástico das formulações elaboradas. Além disso, é importante destacar que a ligeira diferença entre as formulações obtidas e a formulação controle pode estar relacionada à diluição da amostra devido à incorporação de PCN na formulação. Além disso, observou-se que as todas as formulações, bem como a PCN podem ser caracterizadas como fluidos tipo pseudoplástico, identificado pela redução da viscosidade frente ao aumento da taxa de cisalhamento. Os resultados de espalhabilidade (TABELA 7) podem ser correlacionados com a FIGURA 19, onde a redução da viscosidade das formulações adicionadas de PCN resultou em um maior diâmetro de espalhabilidade. Assim, observou-se que quanto menor for a viscosidade da formulação, melhor será sua espalhabilidade.

Os espectros mecânicos das formulações foram avaliados através de testes de varredura de frequência, conforme mostrado na FIGURA 20.

FIGURA 20:VARREDURA DE FREQUÊNCIA ATRAVÉS DO MÓDULO ELÁSTICO (G' - SÍMBOLOS SÓLIDOS) E DO MÓDULO VISCOZO (G'' - SÍMBOLOS ABERTOS) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (HZ), À TEMPERATURA DE 25 °C DE PCN, DA LOÇÃO DE CONTROLE E DAS FORMULAÇÕES ELABORADAS À BASE DE PCN.



FONTE: O autor (2024).

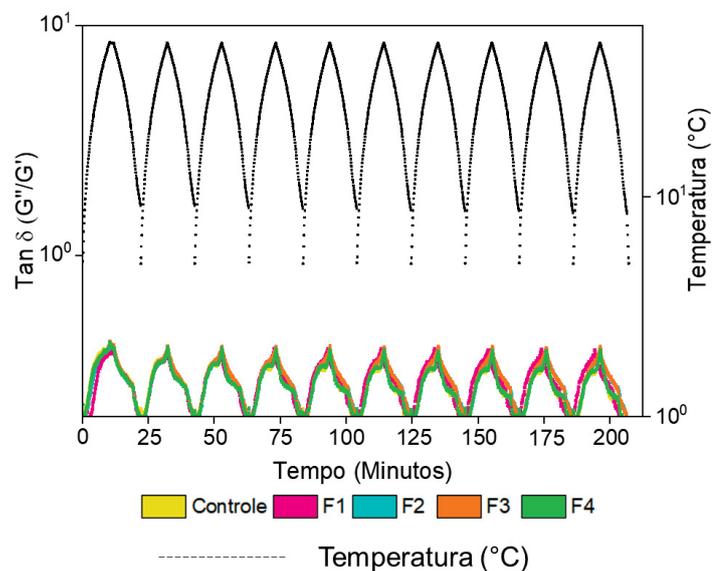
*As amostras F1, F2, F3 e F4 contém respectivamente 0,5%,1%, 1,5% e 2% de PCN em massa na formulação. **PCN (Nanosuspensão da Casca do pinhão com 6% de sólidos totais).

Como observado na FIGURA 20, todas as formulações e o PCN exibiram valores de G' superiores a G'' independentemente da frequência aplicada. Este resultado demonstrou que as formulações exibem uma característica de gel. Além disso, a relação G'/G'' de todas as formulações e PCN foi superior a 3, indicando que as amostras podem ser classificadas como géis fortes (CHAROENCHON *et al.*, 2022). Além disso, a adição de PCN nas formulações reduziu o módulo de armazenamento e perda, o que pode estar relacionado ao elevado teor de água no PCN. No entanto, embora o comportamento da viscosidade das formulações à base de PCN tenha diminuído com o aumento da concentração de PCN (FIGURA 19), o comportamento mecânico não foi afetado, quando comparado entre as formulações elaboradas.

Daudt e colaboradores (2015) avaliaram o amido de pinhão e o extrato de sua casca como aditivos para produção de protótipos de cosméticos. As formulações passaram por uma avaliação abrangente, incluindo o teste de varredura de frequência. Os resultados revelaram que todas as formulações contendo constituintes de pinhão exibiram características semelhantes a gel ($G' > G''$), conforme observado no presente estudo.

Além do comportamento mecânico das formulações, foi avaliado a estabilidade térmica da loção controle e das formulações à base de PCN através do teste de varredura oscilatória de temperatura, conforme mostrado na FIGURA 21. Os resultados foram expressos como $\tan \delta$ (G''/G') em função do tempo (minutos). O valor $\tan \delta$ indica quão elástica ($\tan \delta < 1$) ou plástica ($\tan \delta > 1$) é a formulação.

FIGURA 21: ESTABILIDADE TÉRMICA DA LOÇÃO CONTROLE E DAS FORMULAÇÕES À BASE DE PCN EM FUNÇÃO DO $\tan \delta$ E DO TEMPO (MINUTOS). A FREQUÊNCIA PERMANECEU EM 10 HZ E A TENSÃO DE CISLHAMENTO EM 1 PA.



FONTE: O autor (2024).

*As amostras F1, F2, F3 e F4 contém respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% de PCN (Nanosuspensão da Casca do Pinhão) em massa na formulação.

Conforme FIGURA 21, os valores de $\tan \delta$ encontrados foram menores que 1, demonstrando o comportamento elástico para todas as formulações. Observou-se

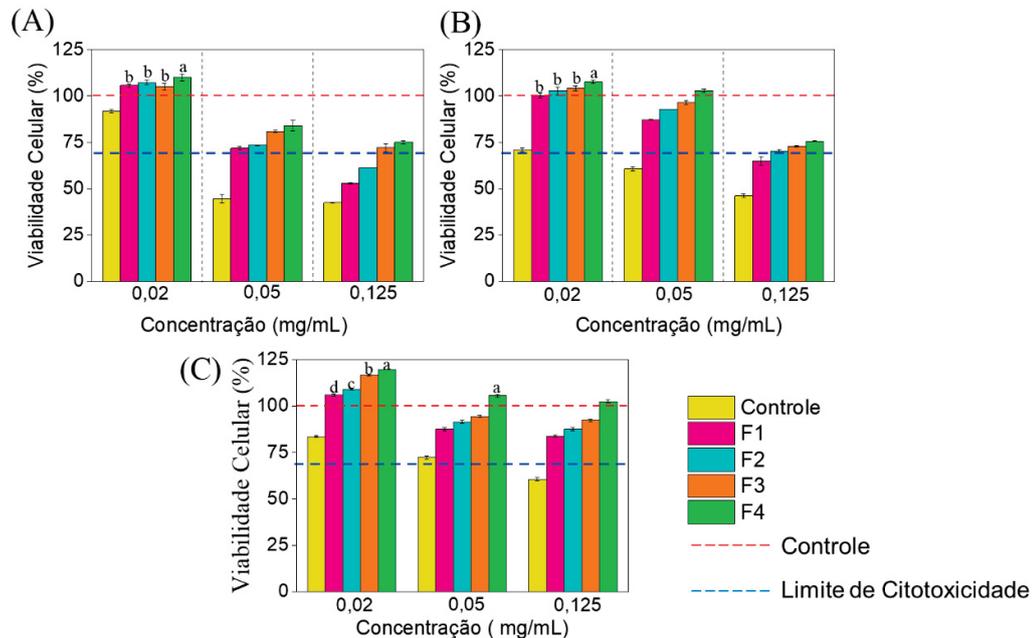
também que os valores máximo e mínimo de $\tan \delta$ não apresentaram alterações significativas durante cada loop térmico avaliado, apesar da adição de PCN em diferentes porcentagens nas formulações. Além disso, destaca-se que todas as formulações manifestaram comportamento semelhante, demonstrando consistência e repetição de padrões devido à sobreposição dos valores identificados. Portanto, apesar do alto teor de água da PCN, a estabilidade térmica das loções permaneceu constante e de forma geral, não foram observadas grandes alterações em seu espectro mecânico, bem como nenhuma separação de fase ao final dos 10 ciclos.

Conforme relatado anteriormente por Karasul e colaboradores (2015), a avaliação de loop térmico é uma maneira precisa para a determinação da estabilidade de uma ampla gama de amostras, como produtos alimentícios e formulações cosméticas. Este teste prevê as mudanças e flutuações de temperatura que ocorrem durante as etapas de processamento e armazenamento.

5.2.4. Avaliação da citotoxicidade das formulações

A loção de controle e as formulações à base de PCN foram avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico empregando o ensaio de viabilidade celular em fibroblastos de camundongo NIH 3T3 (FIGURA 22A) e células normais de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF) (FIGURA 22B) e células HaCat (FIGURA 22C).

FIGURA 22:VIABILIDADE CELULAR DA LOÇÃO DE CONTROLE E FORMULAÇÕES BASEADAS EM PCN EM CÉLULAS DE CAMUNDONGOS DE FIBROBLASTOS NIH 3T3 (A) E CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS (NHDF) (B) E CÉLULAS DE CULTURA CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT) (C).



FONTE: O autor (2024).

*Nota: * Letras sobrescritas diferentes para um mesmo grupo de colunas significam valores de viabilidade celular mais elevados que o controle e diferem-se entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). **As amostras F1, F2, F3 e F4 contém respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% de PCN (Nanosuspensão da Casca do Pinhão) em massa na formulação.

De acordo com a FIGURA 22A-C, as formulações elaboradas empregando a PCN como aditivo não exibiram toxicidade para as células NIH 3T3, NHDF e HaCat para concentrações inferiores a 0,05 mg/mL. Além disso, observou-se que a adição de PCN aumentou a viabilidade celular ($> 70\%$) das formulações cosméticas (ISO 10993-5 (2009)). Esse comportamento pode estar relacionado à presença de compostos bioativos com atividade antioxidante na casca do pinhão (LIMA *et al.*, 2022). Além disso, na concentração mais baixa avaliada (0,02 mg/mL), todas as loções contendo PCN exibiram viabilidade celular superior ao grupo controle para todas as células avaliadas, indicando que os compostos antioxidantes disponíveis na casca do pinhão podem prevenir a oxidação celular, além de aumentar o número de células vivas (HALLIWELL *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2022).

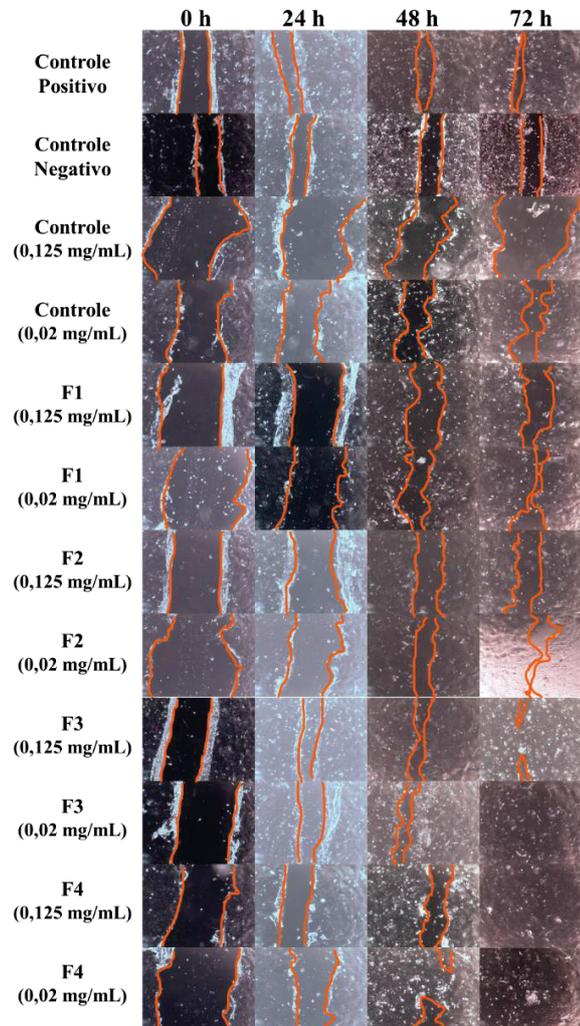
Os resultados do nosso estudo estão alinhados com Kim e colaboradores (2019), que avaliaram a citotoxicidade da suspensão de nanofibrilas de celulose (NFC), avaliando as culturas celulares de NHDF e HaCat para o desenvolvimento de um produto cosmético. Os resultados indicaram que em concentrações inferiores a 0,313 mg/mL, a suspensão não apresentou citotoxicidade, consistente com o comportamento não citotóxico determinado em nosso estudo.

Além disso, ensaios anti-inflamatórios, como aqueles baseados na metodologia MTT, podem ser utilizados como um dos primeiros testes para demonstrar o potencial de cicatrização de feridas de uma formulação cosmética. Portanto, devido à proliferação celular observada para as formulações elaboradas contendo PCN em sua composição, as concentrações mais altas e mais baixas avaliadas no teste de viabilidade celular (0,125 e 0,02 mg/mL) foram aplicadas em estudos adicionais de cicatrização de feridas.

5.2.5. Avaliação da capacidade curativa *in vitro* das formulações

O potencial de cicatrização de feridas *in vitro* foi realizada com base no teste de arranhão em células HaCat. Os resultados da capacidade de fechamento de feridas são demonstrados visualmente na FIGURA 23 e FIGURA 24. Os controles negativo e positivo foram o meio DMEM fresco sem soro e o meio DMEM fresco com solução tampão de fosfato, respectivamente. A análise foi realizada para as formulações controle e formulações elaboradas utilizando a PCN (F1, F2, F3 e F4).

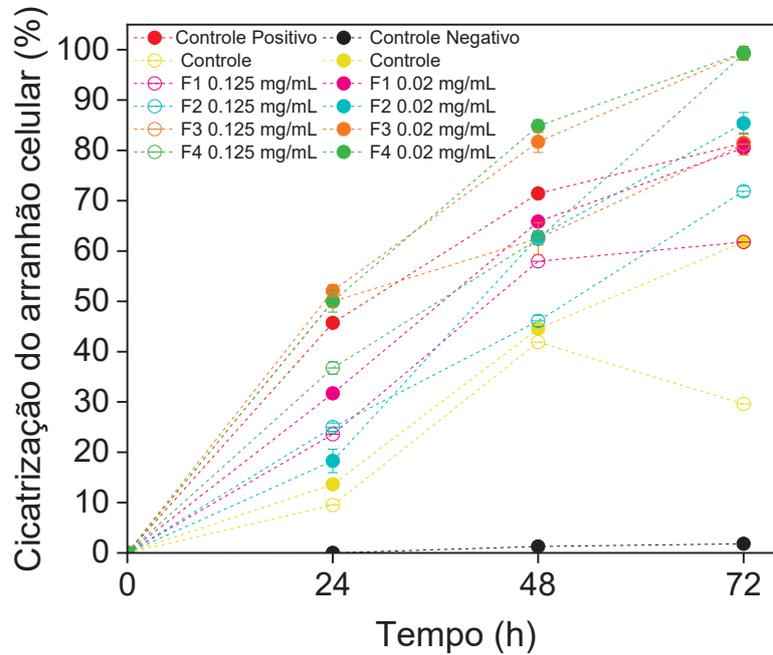
FIGURA 23: TESTE DE ARRANHÃO EM CÉLULAS HaCaT DAS FORMULAÇÕES À BASE DE PCN E FORMULAÇÃO CONTROLE AVALIADAS EM CONCENTRAÇÕES DE 0,02 E 0,125 mg/mL POR 24 HORAS, 48 HORAS E 72 HORAS.



FONTE: O autor (2024).

*As amostras F1, F2, F3 e F4 contêm respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% de PCN (Nanosuspensão da Casca do Pinhão) em massa na formulação.

FIGURA 24: CAPACIDADE DE FECHAMENTO DO ARRANHÃO CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO APÓS 24H, 48H E 72H DE ANÁLISE.



FONTE: O autor (2024).

* A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. **As amostras F1, F2, F3 e F4 contém respectivamente 0,5%, 1%, 1,5% e 2% de PCN (Nanosuspensão da Casca do Pinhão) em massa na formulação.

Conforme mostrado na FIGURA 23 e FIGURA 24, após 72 horas de tratamento, o controle negativo e positivo exibiram 1,8% e 81,4% de fechamento, respectivamente. Além disso, com relação à formulação controle, foi observada capacidade máxima de fechamento de 61,8% na concentração de 0,02 mg/mL. Entretanto, para as formulações cosméticas com maiores adições de PCN (F3 e F4), foi observada contração completa da ferida após 72 horas de tratamento, principalmente na menor concentração avaliada (0,02 mg/mL). Esses resultados estão de acordo com a FIGURA 22A-C, demonstrando que o aumento da presença de PCN nas formulações aumentou a viabilidade celular nas culturas NIH 3T3, NHDF e HaCat.

Além disso, o efeito de cicatrização *in vitro* pode estar relacionado ao efeito citotóxico em células HaCat (FIGURA 22C), uma vez que foi verificada a proliferação celular (viabilidade celular > 100%) na amostra F4, independentemente da concentração

de sólidos utilizados para a realização da análise. Em contraste, a formulação controle foi tóxica para células HaCat para concentrações acima de 0,05 mg/mL. Esses resultados reafirmam os dados obtidos para o efeito curativo (FIGURA 23) e capacidade de fechamento celular (FIGURA 24).

Hakkarainen e colaboradores (2016) avaliaram o potencial de curativos baseados em NFC na pele de pacientes queimados. Os resultados revelaram que os curativos NFC apresentaram alta biocompatibilidade com a pele humana, superando o efeito de epitelização em comparação com um curativo comercial. Esses resultados demonstram as perspectivas promissoras dos materiais celulósicos no desenvolvimento de materiais para cicatrização de feridas (HAKKARAINEN *et al.*, 2016).

Conforme estudo desenvolvido por Lima e colaboradores (2020), a nanosuspensão obtida da casca do pinhão foi submetida à extração empregando etanol: tolueno e água. Como resultado deste processo, ocorreu uma separação de fases (ou seja, fases hidrofóbicas e hidrofílicas), que foram analisadas utilizando equipamento GC-MS. De acordo com seus resultados, a presença predominante de β -sitosterol (449,72 $\mu\text{g/g}$) na fração hidrofóbica, e catequinas (254,51 $\mu\text{g/g}$), catecol (92,46 $\mu\text{g/g}$) e quercetina (70,24 $\mu\text{g/g}$) na fração hidrofílica foram identificadas (LIMA *et al.*, 2020). Assim, como relatado anteriormente, compostos fenólicos, como esteróis, flavonóides, taninos e terpenos, são conhecidos por exibirem mecanismos de ação no processo de cicatrização (CUI *et al.*, 2020; KRISHNAN; THOMAS, 2019). Com relação ao β -sitosterol, estudos anteriores demonstraram sua capacidade de melhorar a migração celular e estimular a atividade de síntese de colágeno (CUI *et al.*, 2020; HAMMAM *et al.*, 2023). Além disso, os flavonóides podem melhorar a cicatrização de feridas, inibindo a peroxidação lipídica, o que reduz o aparecimento de necrose celular e melhora a vascularização (AHMED *et al.*, 2018). Ainda, a presença de taninos na PCN podem favorecer o processo de cicatrização de feridas, melhorando a capilaridade e a formação de fibroblastos (SU *et al.*, 2017).

De forma geral, as formulações produzidas empregando as maiores quantidades de PCN em sua constituição (F3 e F4) apresentaram maiores valores de viabilidade celular nas análises citotóxicas e conseqüentemente maior poder curativo. Esses

resultados estão de acordo com a FIGURA 17, em que se observou um aumento da viabilidade celular da cultura 3T3 com o aumento da concentração de sólidos de PCN.

5.3. APLICAÇÃO DA NANOSUSPENSÃO DO PINHÃO INTEGRAL PARA A PRODUÇÃO DE MASCARAS FACIAIS

5.3.1. Obtenção e avaliação da estrutura das máscaras faciais produzidas a partir da nanosuspensão do pinhão integral

As máscaras faciais a partir da WPN e a máscara controle foram produzidas, como ilustrado na FIGURA 25.

FIGURA 25: MÁSCARAS FACIAIS OBTIDAS A PARTIR DO PINHÃO

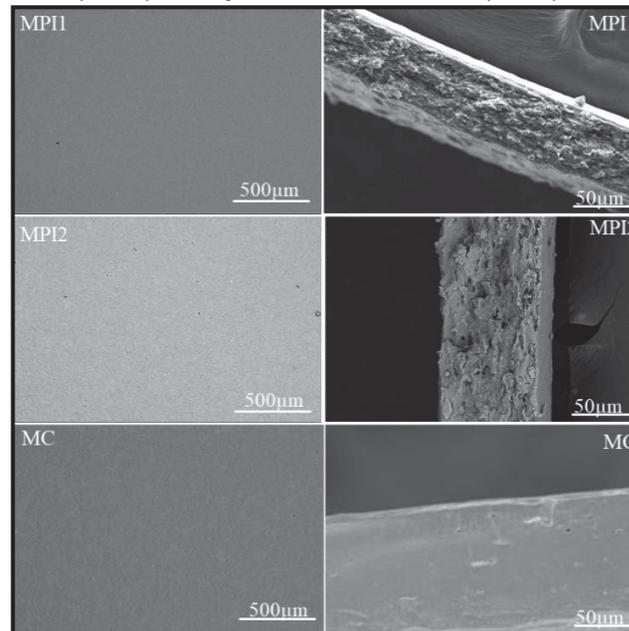


FONTE: O autor (2024).

Nota: *WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. **MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido,58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

As máscaras faciais obtidas a partir da nanosuspensão (FIGURA 25) apresentaram coloração avermelhada quando comparadas ao controle. Essa diferença de cor está relacionada a presença da casca do pinhão em sua composição. Algumas imperfeições nas estruturas das amostras MPI1 e MPI2 foram observadas, e este comportamento foi confirmado em sua morfologia, como ilustrado através das imagens obtidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrado na FIGURA 26.

FIGURA 26: MORFOLOGIA DAS MÁSCARAS OBTIDAS A PARTIR DO PINHÃO, SOB DOIS AUMENTOS, SENDO VISTA SUPERFICIAL (200X) E SEÇÃO TRANSVERSAL (400X)



FONTE: O autor (2024).

Nota: *WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. **MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

Com relação a morfologia das máscaras faciais elaboradas (FIGURA 26) a partir da WPN, verificou-se que as amostras MPI1, MPI2 apresentaram superfície lisa e com pouca rugosidade, quando comparadas ao controle (MC). A superfície lisa e com poucas imperfeições verificadas nas máscaras filmes MPI1 e MPI2 pode ser correlacionada com o teor de nanosuspensão, bem como a presença de interações mais fortes entre suas partículas, as quais, após a secagem sofreram rearranjo, e formaram as amostras em questão (CHEN *et al.*, 2021; LAUREANTI *et al.*, 2021).

Além disso, com relação a seção transversal das máscaras (FIGURA 26) constatou-se que ambas as amostras se diferiram completamente do filme controle. Isto ocorre por conta da presença de fibrilas originárias da nanosuspensão do pinhão integral. Assim, uma vez que ocorre o processo de secagem, ocorre a aproximação das mesmas, e conseqüentemente a formação da estrutura das máscaras (ALIABADI *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Na literatura, não foram encontrados dados de máscaras faciais a partir da nanosuspensão do pinhão integral, sendo utilizado como comparação dados obtidos de filmes biodegradáveis que apresentaram pinhão em sua constituição. Lima e colaboradores (2022) avaliaram a síntese de filmes biodegradáveis a partir da nanosuspensão da casca do pinhão, sendo possível observar que a superfície do filme resultante era lisa. No entanto, na imagem transversal foi possível identificar a presença de fibrilas, provenientes do processo de desfibrilação do complexo lignocelulósico da casca do pinhão.

5.3.2. Caracterização das máscaras faciais obtidas a partir pinhão

As máscaras faciais foram caracterizadas em termos de espessura e cor, como descrito na TABELA 8.

TABELA 8: COR E ESPESSURA DAS MÁSCARAS FACIAIS ELABORADAS A PARTIR DO PINHÃO.

Amostra	Espessura (mm)	L*	Cor		ΔE
			a	b	
MPI1	0,123 \pm 0,13 ^a	33,46 \pm 0,40 ^e	28,48 \pm 0,06 ^a	26,68 \pm 0,58 ^a	68,18 \pm 0,26 ^a
MPI2	0,119 \pm 0,10 ^{a,b}	34,62 \pm 0,28 ^d	27,06 \pm 0,37 ^b	24,05 \pm 0,87 ^b	66,58 \pm 0,87 ^b
MC	0,103 \pm 0,23 ^b	90,54 \pm 0,23 ^a	-1,72 \pm 0,47 ^e	1,11 \pm 0,67 ^c	-

FONTE: O autor (2024).

* Nota: *Letras diferentes em um mesmo grupo de colunas demonstram diferença significativa entre si (ANOVA, Tukey LSD; $p < 0,05$). **WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral). ***MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

Com relação aos dados de espessura das máscaras faciais sintetizadas (TABELA 88), constatou-se que a diminuição do teor de plastificante promoveu redução na espessura das máscaras faciais obtidas a partir da nanosuspensão do pinhão integral. Isto ocorre devido ao aumento da concentração de nanosuspensão do pinhão integral, e consequentemente maior presença de fibrilas. De tal forma, a amostra MPI1 apresentou a maior espessura avaliada (0,123 \pm 0,13 mm), enquanto que o filme controle (FC) apresentou o menor valor encontrado (0,103 \pm 0,23 mm). Na literatura, foi verificado comportamento semelhante em filmes sintetizados a partir da adição de celulose micro

fibrilar (MFC), utilizando amido de milho (CHEN *et al.*, 2021) e a partir da proteína de soja (ORTIZ *et al.*, 2018).

A cor das máscaras faciais também foi avaliada, como demonstrado na TABELA 8, sendo verificado que as amostras sintetizadas a partir da WPN apresentaram baixos valores de luminosidade (L), quando comparados com o controle. Em contrapartida, devido a presença da casca do pinhão, os valores da coordenada “a” e “b” foram superiores, quando comparados com o filme controle. Além disso, também se avaliou a variação total de cor (ΔE) entre as amostras obtidas e a máscara controle, constatando valores totalmente distintos quando comparados a máscara controle. Além de tudo, observou-se que a amostra MPI1 ($\Delta E = 68,18 \pm 0,26$) apresentou maior diferença de cor frente a amostra MPI2, quando comparada com o filme controle.

5.3.3. Avaliação da umidade e solubilidade das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão

A umidade e a solubilidade das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão foram avaliadas, como demonstrado na TABELA 9.

TABELA 9: HIDROFILICIDADE (UMIDADE E SOLUBILIDADE) DOS FILMES SINTETIZADOS DO PINHÃO.

Amostra	Umidade (%)	Solubilidade em água (%)
MPI1	9,94 \pm 0,49 ^c	35,92 \pm 0,69 ^c
MPI2	11,07 \pm 1,23 ^b	43,80 \pm 0,25 ^b
MC	14,63 \pm 0,24 ^a	51,63 \pm 0,21 ^a

FONTE: O autor (2024).

* Nota: *Letras diferentes em um mesmo grupo de colunas apresentam diferença significativa entre si (ANOVA, Tukey LSD; $p < 0,05$). **WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. ***MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

Com relação as propriedades hidrofílicas dos filmes (TABELA 9), verificou-se que o aumento do teor de plastificante proporcionou maior umidade e solubilidade das amostras. De tal forma, a amostra MPI1 apresentou os menores valores de umidade (9,94

$\pm 0,49$ %) e solubilidade ($35,92 \pm 0,69$ %), enquanto que a amostra controle apresentou os maiores valores de umidade ($14,63 \pm 0,24$ %) e solubilidade ($51,63 \pm 0,21$ %)

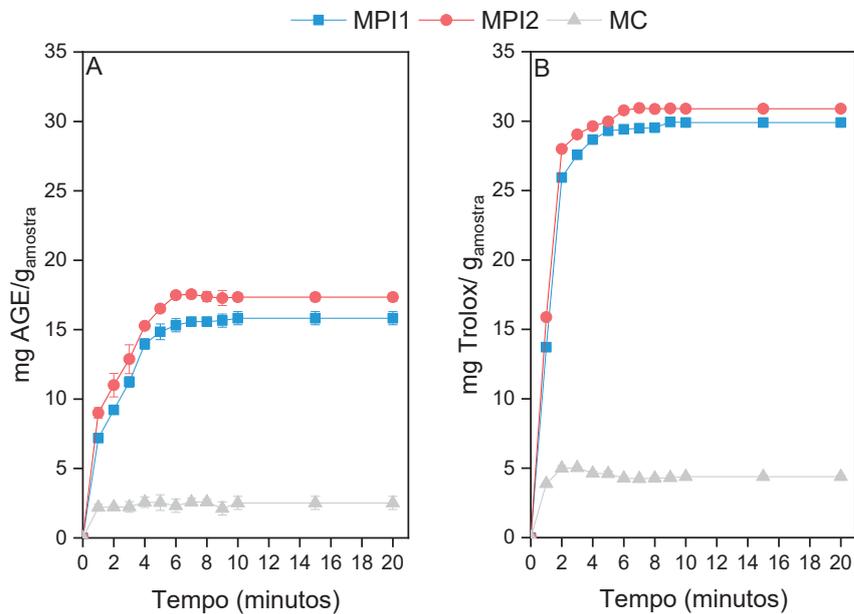
A variação das propriedades de hidrofílicas das máscaras faciais com o teor de plastificante está interligado principalmente a presença de glicerol. A presença do plastificante, o qual é de caráter hidrofílico, facilita a interação com a água, e consequentemente aumenta a afinidade da amostra com a água (ALIMI *et al.*, 2022).

Entretanto, quando ocorre diminuição do teor de plastificante, e consequente aumento da concentração de nanosuspensão na formulação nas máscaras faciais, ocorre a diminuição das interações das máscaras com a água. Esse fenômeno está relacionado a formação de interações de hidrogênio entre os constituintes das máscaras faciais, melhorando sua coesão e diminuindo sua interação com água, o que pode afetar na liberação dos compostos bioativos presentes.

5.3.4. Liberação de compostos antioxidantes (*in vitro*) das máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão.

A liberação dos compostos bioativos presentes nas máscaras faciais (FIGURA 27) elaboradas a partir do pinhão foi avaliada utilizando as metodologias de atividade antioxidante de compostos fenólicos totais (FIGURA 27A) e capacidade de redução do radical livre DPPH (FIGURA 27B).

FIGURA 27: LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DAS MÁSCARAS FACIAIS DE PINHÃO A PARTIR DAS METODOLOGIAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (A) E CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH (B).



FONTE: O autor (2024).

Nota: *MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

Com relação à liberação de compostos bioativos (FIGURA 27) observou-se que a partir de 5 minutos ocorreu a liberação máxima dos compostos, como observado em ambas as metodologias utilizadas. Além disso, a presença da WPN foi fundamental para o aumento da atividade antioxidante das amostras, quando comparadas as amostras controle (MC) das amostras adicionadas da nanosuspensão do pinhão integral (MPI1 e MPI2).

Observou-se que a presença do plastificante na formulação fez com que a amostra MPI2 apresentasse uma maior liberação de compostos bioativos quando comparada com MPI1. Esse comportamento pode ser relacionado com os dados de hidrofiliabilidade (TABELA 9), morfologia (FIGURA 26). De tal forma, constatou-se que a máscara facial MPI2 apresentou os maiores valores de umidade e solubilidade em água, além de apresentar morfologia menos compacta, e menor resistência mecânica quando comparada a amostra MPI1. Assim, com a estrutura um pouco comprometida, e

consequentemente maiores propriedades hidrofílicas, a amostra MPI2 apresentou maior liberação de compostos bioativos durante a análise de liberação.

Silva e colaboradores, (2019) realizaram a extração e a análise de DPPH para avaliar a atividade antioxidante dos filmes adicionados de extrato de pinhão. Como resultados, os autores identificaram $0,6 \pm 0,16$ e $0,83 \pm 0,11$ ($\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}$) para os filmes compostos por 0,5% e 0,75% de extrato da casca do pinhão, respectivamente.

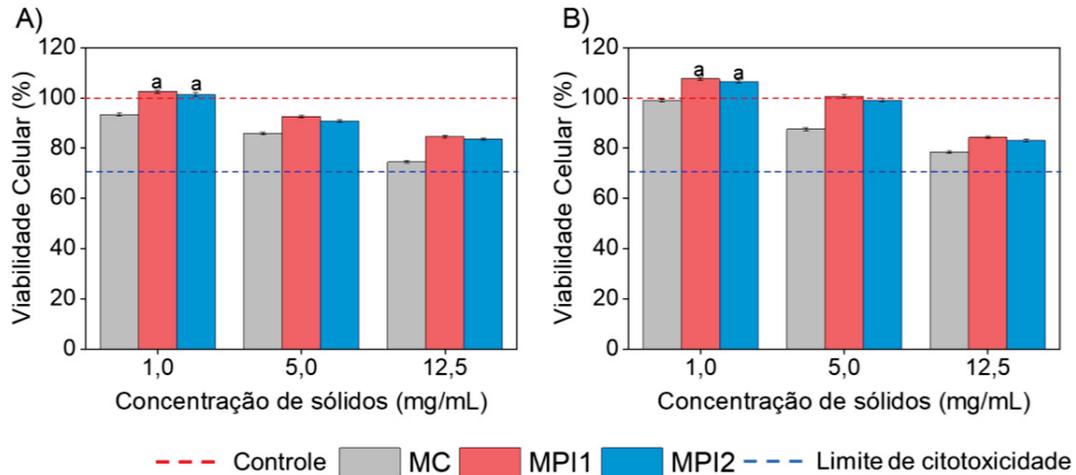
De Freitas e colaboradores, (2018) avaliaram a atividade antioxidante de filmes a base de zeína, (proteína do milho) adicionados do extrato da casca do pinhão. Os autores observaram que a maior atividade antioxidante foi identificada nos filmes sintetizado a partir da água de cozimento do pinhão, apresentando valores de $0,03 \pm 0,08$ $\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}$ na análise DPPH, $0,1366 \pm 0,09$ $\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}$ para ABTS e $0,0051 \pm 0,001$ $\text{mg}_{\text{Trolox}}/\text{g}$ na análise FRAP.

Em comparação com a literatura, apesar da metodologia para a produção das máscaras faciais ser a mesma dos filmes biodegradáveis citados, os dados obtidos são distintos uma vez que foi utilizada a nanosuspensão para a síntese. De tal forma, comparando os dados obtidos com os resultados disponíveis na literatura, observou-se que as máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão apresentaram maior atividade antioxidante frente os filmes já sintetizados.

5.3.5. Citotoxicidade das máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão

A citotoxicidade das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão foi avaliada em diferentes culturas celulares, como pode ser observado nas FIGURAS 28 (A e B).

FIGURA 28: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS MÁSCARAS FACIAIS OBTIDAS A PARTIR DO PINHÃO EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE RATOS (NIH-3T3) (A) E FIBROBLASTOS HUMANOS (NHDF) (B).



FONTE: O autor (2024).

*Nota: * Letras sobrescritas diferentes para um mesmo grupo de colunas significam valores de viabilidade celular mais elevados que o controle e diferem-se entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). **WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. ***MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

De acordo com a FIGURA 28A-B, as máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão demonstraram ausência de citotoxicidade (viabilidade celular $> 70\%$) para ambas as culturas celulares avaliadas (NIH 3T3 e NHDF) em todas as concentrações de sólidos testadas. Além disso, destaca-se que a inclusão da WPN na formulação das máscaras faciais contribuiu para um aumento na viabilidade celular em comparação com a máscara facial controle. Este efeito positivo pode ser atribuído à presença de compostos bioativos com atividade antioxidante previamente identificados na WPN (TABELA 5 E TABELA 6) e verificados na análise de liberação de compostos bioativos (FIGURA 27A-B).

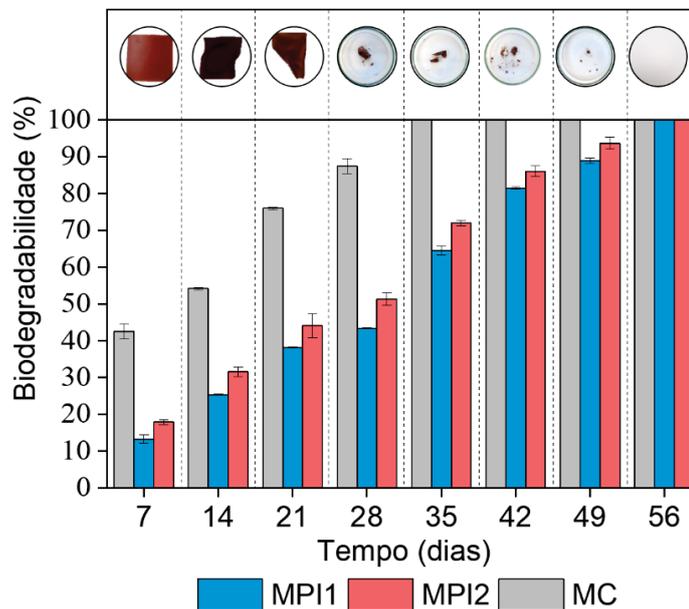
É importante ressaltar que, para a concentração mais baixa avaliada (1,0 mg/mL), as máscaras faciais derivadas da WPN promoveram a proliferação celular (viabilidade celular $> 100\%$). De tal forma, esses resultados corroboram com os achados das formulações à base de PCN (FIGURA 22A-C), indicando que os compostos antioxidantes presentes na casca do pinhão têm um impacto significativo no aumento da viabilidade celular nas células avaliadas.

Lima e colaboradores (2022) investigaram a viabilidade celular de filmes formados a partir da PCN em células Schwann e na cultura celular NIH-3T3, revelando a ausência de citotoxicidade em todas as concentrações avaliadas. Além disso, observou-se proliferação celular para concentrações inferiores 1,0 mg/mL (LIMA *et al.*, 2022). De forma geral, os resultados obtidos com as máscaras faciais à base de pinhão apresentam grande potencial, destacando-se pela ausência de citotoxicidade nas concentrações avaliadas.

5.3.6. Avaliação da biodegradabilidade das máscaras faciais elaboradas a partir do pinhão

A biodegradabilidade das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão foi avaliada, através dos dados de perda de massa, a cada 7 dias, como demonstrado na FIGURA 29.

FIGURA 29: AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DAS MASCARAS FACIAIS ELABORADAS A PARTIR DO PINHÃO.



FONTE: O autor (2024).

Nota: *WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. **MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

Com relação a biodegradabilidade das máscaras faciais elaboradas (FIGURA 29) constatou-se que ao final da análise todas as amostras foram consumidas pelo solo. Além disso, observou-se que as amostras MPI2 e MC apresentaram degradação mais acelerada frente a amostra MPI1. Conforme a norma padrão vigente, os as máscaras faciais podem ser consideradas completamente biodegradáveis, uma vez que ocorreu perda de 100% dentro do período estipulado pelos padrões internacionais (ASTM D6400, 2012; ASTM D5338, 2002; ISO 14855, 2003).

As características das máscaras faciais, tais como natureza da amostra, umidade, solubilidade em água e morfologia interferem na biodegradabilidade do material. Observou-se que as amostras com maior umidade e solubilidade em água (MC e MPI2) (TABELA 9) apresentaram decomposição mais acelerada frente à amostra MPI1. Este resultado pode ser correlacionado com a morfologia das amostras (FIGURA 26), bem como a baixa resistência a tração dos filmes (TABELA 10) tornando mais acessível a ação e degradação das amostras por ação dos microrganismos (LAUREANTI *et al.*, 2021; SILVA-RODRIGUES *et al.*, 2020).

Em comparação com a literatura, o tempo para biodegradabilidade das máscaras faciais sintetizadas foi inferior frente a decomposição da casca do pinhão na natureza. Apesar de ambos apresentarem a presença do complexo lignocelulósico em sua constituição, a síntese da nanosuspensão do pinhão integral e aplicação para o desenvolvimento de máscaras faciais, resultou em um produto promissor, por apresentar características biodegradáveis, de baixa citotoxicidade, e rápida liberação de compostos bioativos.

5.3.7. Aplicação das máscaras faciais obtidas a partir do pinhão

Observou-se que o emprego da nanosuspensão do pinhão integral permitiu a síntese de um produto de baixa umidade, facilitando seu acondicionamento. No entanto, sua utilização apresenta alguns desafios por conta de suas características. Assim, foram realizados testes de aplicação, a fim de aumentar a adesividade e liberação de compostos bioativos da máscara. Tendo como base a FIGURA 27A FIGURA 27B,

observou-se que após 5 minutos de imersão em solução as máscaras já apresentaram liberação máxima dos compostos bioativos.

Desta forma, foram avaliadas as propriedades mecânicas das máscaras faciais, tais como resistência a tração e alongação antes da imersão em água, e após imersão em água durante 5 minutos, como pode ser observado na TABELA 10.

TABELA 10: PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO) DAS MÁSCARAS FACIAIS ELABORADAS A PARTIR DO PINHÃO.

Amostra	Resistência a tração (MPa) antes da imersão	Elongação (%) antes da imersão em água	Resistência a tração após imersão em água*** (MPa)	Elongação após imersão em água (%)****
MPI1	16,56 ± 1,97 ^a	15,82 ± 1,47 ^b	2,03 ± 0,32 ^a	38,82 ± 1,64 ^c
MPI2	13,81 ± 2,13 ^b	16,81 ± 0,54 ^b	1,29 ± 0,13 ^b	45,11 ± 2,17 ^b
MC	11,87 ± 2,15 ^c	17,65 ± 0,95 ^a	0,57 ± 0,15 ^c	51,14 ± 0,84 ^a

FONTE: O autor (2024).

* Nota: *Letras diferentes em um mesmo grupo de colunas demonstram diferença significativa entre si (ANOVA, Tukey LSD; $p < 0,05$). **WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. ***MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido, 58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)). **** Nota: As amostras foram imersas completamente em água deionizada por cinco minutos, em uma razão sólido: líquido de 1:20 g/mL.

As propriedades mecânicas dos filmes (TABELA 10) foram avaliadas, e constatou-se que a adição do plastificante, diminuiu a resistência a tração dos filmes. Em contrapartida, houve um aumento da elasticidade das amostras. De tal forma, a máscara facial MPI1 (16,56 ± 1,97 MPa) demonstrou maior resistência a tração, enquanto que a amostra controle (MC) (17,65 ± 0,95 %) apresentou maior alongação frente as outras amostras. Além disso, observou-se que o aumento do teor de nanosuspensão do pinhão integral proporcionou aumento na resistência a tração das máscaras sintetizadas. Esse resultado pode ser correlacionado com a incorporação dos constituintes da nanosuspensão, que dentre outros constituintes, contém em sua composição celulose e hemicelulose. Essas macromoléculas apresentam caráter estrutural e conferem rigidez e resistência mecânica às formulações em que são adicionados.

Observou-se que o aumento do teor de plastificante diminuiu a resistência mecânica das máscaras e aumentou sua alongação. Esse comportamento está

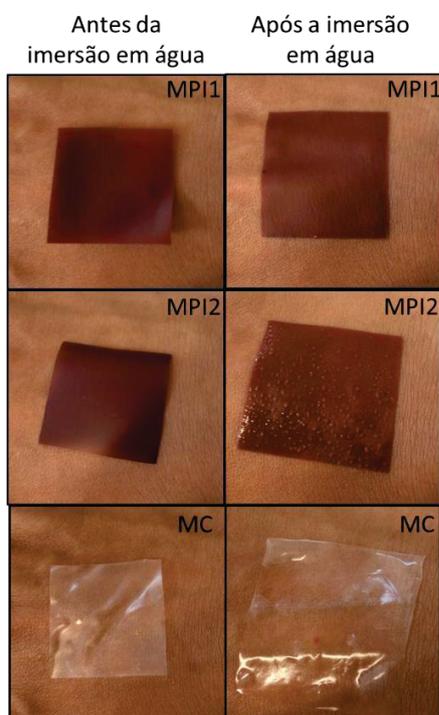
relacionado com a diminuição das interações entre os componentes da máscara elaborada e aumento de interações com o plastificante utilizado, aumentando a elasticidade das amostras, e ao mesmo tempo diminuindo sua resistência (SANYANG *et al.*, 2015). O comportamento inversamente proporcional entre alongação e resistência a tração foi observado por diversos autores (CHEN *et al.*, 2021; DAUDT *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2018).

Na literatura, não foram encontrados dados de máscaras faciais a partir da nanosuspensão do pinhão integral, sendo utilizado como comparação dados obtidos de filmes biodegradáveis que apresentaram pinhão em sua constituição. Silva e colaboradores, (2019) avaliaram a síntese de filmes biodegradáveis a partir de amido, Poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT), glicerol e extrato da casca do pinhão. Como resultado, os autores verificaram que o aumento da adição de extrato da casca de pinhão, não foi significativo nos dados de permeabilidade ao vapor d'água, encontrando valores de propriedades mecânicas na ordem de $5,50 \pm 0,43$ MPa para resistência a tração dos filmes, enquanto que a alongação foi de $280,18 \pm 80,18$ %. Nesse trabalho verificou-se que o acréscimo de extrato de pinhão na formulação, aumentou a alongação dos filmes

De forma geral, as propriedades mecânicas das máscaras produzidas no presente trabalho apresentaram comportamento semelhante quanto ao aumento do teor de plastificante. A resistência a tração obtida para a amostra MPI1 ($16,56 \pm 1,97$ MPa) foi superior frente aos dados comparados.

Com relação à imersão das amostras em água como preparo para aplicação, observou-se que após cinco minutos de exposição, as máscaras apresentaram grande redução da resistência mecânica e aumento em sua alongação, como observado na (TABELA 10). Além disso, verificou-se uma melhor conformação das máscaras à pele, como visualmente observado na FIGURA 30.

FIGURA 30:FRAÇÕES DAS MÁSCARAS FACIAIS AVALIADAS ANTES E APÓS A IMERSÃO EM ÁGUA.



FONTE: O autor (2024).

Nota: *WPN (Nanosuspensão do Pinhão Integral. **MPI1 (60,8g de WPN e 0,6g de plastificante (glicerol)), MPI2 (60,4g de WPN e 1 g de plastificante (glicerol)), MC (2,0g de amido,58,8g de água, e 0,6g de plastificante (glicerol)).

Com relação à FIGURA 30, verificou-se que as máscaras elaboradas a partir da nanosuspensão do pinhão integral (MPI1 e MPI2), bem como a máscara controle (MC) melhoraram sua conformação à pele, após a imersão em água. Além disso, como avaliado anteriormente (FIGURA 27A-B), o tempo de imersão utilizado acelera a liberação dos compostos bioativos, podendo potencializar a ação da máscara facial na pele humana.

6. CONCLUSÕES

O pinhão apresenta alto teor de compostos bioativos, tais como compostos fenólicos, flavonoides e fitoesteróis, os quais estão interligados a diversos benefícios à saúde humana, tais como ação antioxidante, antidiabética, anticancerígena e anti-hiperlipidêmica. Além disso, outra propriedade proveniente da casca do pinhão é a presença do complexo lignocelulósico, contendo significativos teores de celulose, hemicelulose e lignina.

O uso do moinho de pedras é uma alternativa para processar o material lignocelulósico, uma vez que previne a degradação dos biocompostos e proporciona a obtenção de nanosuspensões ricas em compostos bioativos. Além disso, a caracterização das nanosuspensões é de grande importância a fim de verificar as propriedades das amostras, bem como sua constituição para a aplicação como aditivos naturais em diferentes processos e produtos. Os resultados indicaram que as nanosuspensões obtidas apresentaram características distintas entre si, uma vez que são sintetizadas a partir de diferentes frações do pinhão, sendo necessárias diferentes aplicações para cada fração sintetizada.

A fração da casca do pinhão foi adicionada em formulação cosmética, e através dos resultados obtidos, verificou-se que a adição da nanosuspensão da casca do pinhão melhorou as espalhabilidade das formulações, modificando a viscosidade e o comportamento mecânico das formulações. Além disso, observou-se que o aumento da concentração da nanosuspensão da casca do pinhão melhorou a viabilidade celular das formulações elaboradas, conferindo maior poder cicatrizante para as amostras cosméticas avaliadas.

A nanosuspensão do pinhão integral foi utilizada para a produção de máscaras faciais, as quais demonstraram propriedades mecânicas promissoras, bem como rápida liberação de compostos bioativos, o que contribuiu para um aumento da viabilidade celular. Além disso, as máscaras faciais apresentaram total biodegradabilidade em um período total de 56 dias. Observou-se que a imersão das máscaras faciais em água por

cinco minutos melhorou sua adesividade, bem como facilita a liberação dos compostos bioativos, podendo aumentar sua eficácia ao ser aplicada na pele humana.

De forma geral, a produção das nanosuspensões modificou a propriedades das do pinhão e seus constituintes aumentando a gama de potenciais aplicações. Além disso, as nanosuspensões demonstraram ser potenciais alternativas para o manejo sustentável e valorização da araucária e seus produtos, visando a conservação e manutenção da espécie.

6.1. Produção científica decorrente do período de doutorado (março de 2020 – fevereiro de 2024).

LEAL, F. C.; UEDA, K. M.; SAMPONI, M. A. T.; LIMA, T. A. L.; HANSEL, A. F.; MAGALHÃES, W. L. E.; HELM, C. V.; FREITAS, R. A.; FARIAS, F. O.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L. Impact of defibrillation technique on the rheological, thermo-mechanical, and nutritional properties of nanosuspensions produced from multiple fractions of pinhão seed (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze). **Food Chemistry** [s. l.], v. 440, n. 2024.

LEAL, F. C.; UEDA, K. M.; LIMA, T. A. L.; FREITAS, R. A.; HELM, C. V.; MAGALHÃES, W. L. E.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L. Pinhão coat (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) nanosuspension as a potential additive in cosmetic formulations with wound healing effect. **Waste and Biomass Valorization**, 2024.

UEDA, K. M.; KEISER, G. M.; LEAL, F. C.; FARIAS, F. O.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. A new single-step approach based on Supramolecular Solvents (SUPRAS) to extract bioactive compounds with different polarities from *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaia) pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2024.

UEDA, K. M.; LEAL, F. C.; FARIAS, F. O.; MUSSAGY, C. U.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Enhancing the carotenoid recovery from *Eugenia uniflora* L. pulp: A comparative study of supramolecular solvents, ionic liquids, and deep eutectic solvents. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 324, n. p. 124632, 2023.

LEAL, F. C.; FARIAS, F. O.; DO AMARAL, W.; TOCI, A. T.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L. Green Solvents to Value *Annona muricata* L. Leaves as Antioxidants Source: Process Optimization and Potential as a Natural Food Additive. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1233–1241, 2022.

RONKO, L. Z.; ANTONIASSI, M. A.; UEDA, K. M.; LEAL, F. C.; TOCI, A. T.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R.; FARIAS, F. O. Valorization of Raw Coffee Beans (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) through Solvent Development and Extraction of Bioactive Compounds. **Separations**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2022.

TOAZZA, C. E. B.; LEAL, F. C.; MARQUES, C.; OLIVEIRA, G.; FARIAS, F. O.; BELAN, A. L. D.; LEITE, N. F.; MAFRA, M. R.; IGARASHI-MAFRA, L.; MASSON, M. L. Bioactive compounds extraction from different lemongrass species: Strategies and deep eutectic solvents evaluation. **Journal of Food Process Engineering**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 1–14, 2022.

REFERÊNCIAS

ADOLFO-LUTZ INSTITUTE. **Métodos físico-químicos para análise em alimentos IV**. IVed. São Paulo: [s. n.], 2008. 2008.

AHMED, O. M.; MOHAMED, T.; MOUSTAFA, H.; HAMDY, H.; AHMED, R. R.; ABOUD, E. Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 101, n. February, p. 58–73, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.040>.

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, [s. l.], v. 4, n. December 2020, p. 200–214, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>.

ALI, M. C.; CHEN, J.; ZHANG, H.; LI, Z.; ZHAO, L.; QIU, H. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. **Talanta**, [s. l.], v. 203, n. May, p. 16–22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012>.

ALI, S. M.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From basic science to basic skin care. **Acta Dermato-Venereologica**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 261–267, 2013.

ALIABADI, M.; CHEE, B. S.; MATOS, M.; CORTESE, Y. J.; NUGENT, M. J. D.; DE LIMA, T. A. M.; MAGALHÃES, W. L. E.; DE LIMA, G. G. Yerba mate extract in microfibrillated cellulose and corn starch films as a potential wound healing bandage. **Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1–18, 2020.

ALIMI, B. A.; WORKNEH, T. S.; ZUBAIR, B. A. Microstructural and physicochemical properties of biodegradable films developed from false banana (*Ensete ventricosum*) starch. **Heliyon**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. e09148, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09148>.

ALMEIDA, T.; MOREIRA, P.; SOUSA, F. J.; PEREIRA, C.; SILVESTRE, A. J. D.; VILELA, C.; FREIRE, C. S. R. Bioactive Bacterial Nanocellulose Membranes Enriched with *Eucalyptus globulus* Labill. Leaves Aqueous Extract for Anti-Aging Skin Care Applications. **Materials**, [s. l.], v. 15, n. 5, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/5/1982>.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International Arlington. **AOAC International**, [s. l.], v. 20 th Ed., 2016.

ASTM D6400. ASTM D6400 - Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities | Engineering360. **Astm**, [s. l.], p. 3, 2012. Disponível em: <https://standards.globalspec.com/std/1526677/ASTM>

D6400.

ASTMD5338. ASTM D5338-Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Accelerated Landfill Conditions 1. **Significance**, [s. l.], v. 94, n. May 1994, p. 1–5, 2002.

AYAZ, M.; SADIQ, A.; WADOOD, A.; JUNAID, M.; ULLAH, F.; ZAMAN KHAN, N. Cytotoxicity and molecular docking studies on phytosterols isolated from Polygonum hydropiper L. **Steroids**, [s. l.], v. 141, n. June 2018, p. 30–35, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.11.005>.

BAI, G.; MA, C.; CHEN, X. Phytosterols in edible oil: Distribution, analysis and variation during processing. **Grain & Oil Science and Technology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 33–44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2020.12.003>.

BARBASH, V. A.; YASHCHENKO, O. V.; VASYLIEVA, O. A. Preparation and Properties of Nanocellulose from Miscanthus x giganteus. **Journal of Nanomaterials**, [s. l.], v. 2019, 2019.

BAYRAMI, Z.; HAJIAGHAEI, R.; KHALIGHI-SIGAROODI, F.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H.; HODJAT, M.; BAEERI, M.; RAHIMIFARD, M.; NAVAEI-NIGJEH, M.; ABDOLLAHI, M. Bio-guided fractionation and isolation of active component from Tragopogon graminifolius based on its wound healing property. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 226, p. 48–55, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.002>.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 36, p. 91–106, 2014.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924>. Acesso em: 17 set. 2019.

BICUDO, S. C. W.; DEMIATE, I. M.; BANNACH, G.; LACERDA, L. G.; FILHO, M. A. S. C.; IONASHIRO, M.; SCHNITZLER, E. Thermoanalytical study and characterization of native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O. Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mill). **Ecletica Quimica**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 7–12, 2009.

BONGAO, H. C.; GABATINO, R. R. A.; ARIAS, C. F. H.; MAGDALUYO, E. R. Micro/nanocellulose from waste Pili (*Canarium ovatum*) pulp as a potential anti-ageing ingredient for cosmetic formulations. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 22, p. 275–280, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.08.117>.

BRANCO, C. S.; RODRIGUES, T. S. Chemical Constituents and Biological Activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **Journal of Organic & Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–10, 2016.

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

CADEMARTORI, P. H. G. de; ARTNER, M. A.; ALVES DE FREITAS, R.; MAGALHÃES, W. L. E. Alumina nanoparticles as formaldehyde scavenger for urea-formaldehyde resin: Rheological and in-situ cure performance. **Composites Part B: Engineering**, [s. l.], v. 176, n. August, 2019.

CAPOLUPO, L.; FARACO, V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 22, p. 9451–9467, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7884-y>.

CARRIER, M.; LOPPINET-SERANI, A.; DENUX, D.; LASNIER, J. M.; HAM-PICHAVENT, F.; CANSELL, F.; AYMONIER, C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 298–307, 2011.

CASSONI, A. C.; COSTA, P.; VASCONCELOS, M. W.; PINTADO, M. Systematic review on lignin valorization in the agro-food system : From sources to applications. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 317, n. May 2021, p. 115258, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115258>.

CHAROENCHON, N.; RHODES, L. E.; NICOLAOU, A.; WILLIAMSON, G.; WATSON, R. E. B.; FARRAR, M. D. Ultraviolet radiation-induced degradation of dermal extracellular matrix and protection by green tea catechins: a randomized controlled trial. **Clinical and Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 1314–1323, 2022.

CHEN, C.; ZONG, L.; WANG, J.; XIE, J. Microfibrillated cellulose reinforced starch/polyvinyl alcohol antimicrobial active films with controlled release behavior of cinnamaldehyde. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 272, n. April, p. 118448, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118448>.

CHIPÓN, J.; RAMÍREZ, K.; MORALES, J.; DÍAZ-CALDERÓN, P. Rheological and Thermal Study about the Gelatinization of Different Starches (Potato, Wheat and Waxy) in Blend with Cellulose Nanocrystals. **Polymers**, [s. l.], v. 14, n. 8, 2022.

CHO, K. S.; LIM, Y.-R.; LEE, K.; LEE, J.; LEE, J. H.; LEE, I.-S. Terpenes from Forests and Human Health. **Toxicological research**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 97–106, 2017.

CHU, C. C.; NYAM, K. L. Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil: Application as cosmetic product ingredients. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 156, n. August, p. 112871, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112871>.

CLARO, F. C.; JORDÃO, C.; DE VIVEIROS, B. M.; ISAKA, L. J. E.; VILLANOVA JUNIOR, J. A.; MAGALHÃES, W. L. E. Low cost membrane of wood nanocellulose obtained by mechanical defibrillation for potential applications as wound dressing. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 18, p. 10765–10779, 2020.

CORDENUNSI, B. R.; DE MENEZES, E. W.; GENOVESE, M. I.; COLLI, C.; GONÇALVES DE SOUZA, A.; LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 3412–3416, 2004.

COSTA DE CONTO, L.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; JOY STEEL, C.; CHANG, Y. K. Physico-chemical, morphological, and pasting properties of Pine nut (*Araucaria angustifolia*) starch oxidized with different levels of sodium hypochlorite. **Starch/Staerke**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 198–208, 2011.

CUI, S.; JIANG, H.; CHEN, L.; XU, J.; SUN, W.; SUN, H.; XIE, Z.; XU, Y.; YANG, F.; LIU, W.; FENG, F.; QU, W. Design, synthesis and evaluation of wound healing activity for β -sitosterols derivatives as potent Na^+/K^+ -ATPase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 98, n. December 2018, p. 103150, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103150>.

CURVELLO, R.; RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIER, G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 267, p. 47–61, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868619300028>.

DAUDT, R. M.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; WILLIAMS, T.; WOOD, D. F.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; MARCZAK, L. D. F.; MCHUGH, T. H. Comparative study on properties of edible films based on pinhão (*Araucaria angustifolia*) starch and flour. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 60, p. 279–287, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.040>.

DAUDT, R. M.; BACK, P. I.; CARDOZO, N. S. M.; MARCZAK, L. D. F.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 134, p. 573–580, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.038>.

DAUDT, R. M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVERA, F.; THYS, R. C. S.; MARCZAK, L. D. F. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 52, p. 420–429, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.052>.

DHANASEKARAN, M.; IGNACIMUTHU, S.; AGASTIAN, P. Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 891–895, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.006>.

DJURICIC, I.; CALDER, P. C. Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 7, 2021.

FERREIRA, E.; SILVA, R.; ROSA, B.; MINHO, A. C.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, M. D. J.; VIEIRA, M.; SILVA, L.; NEI, W.; MARIA, A. Characterization of the chemical composition (mineral, lead and centesimal) in pine nut (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) using exploratory data analysis. **Food Chemistry**, [s. l.], p. 130672, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130672>.

FREITAS, T. B.; SANTOS, C. H. K.; DA SILVA, M. V.; SHIRAI, M. A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 15, n. April 2017, p. 28–34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.10.006>.

GARCIA-LLATAS, G.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; CILLA, A. Current methodologies for phytosterol analysis in foods. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 168, n. December 2020, 2021.

GHAEDI, E.; FOSHATI, S.; ZIAEI, R.; BEIGREZAEI, S.; KORD-VARKANEH, H.; GHAVAMI, A.; MIRAGHAJANI, M. Effects of phytosterols supplementation on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 2702–2710, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.12.020>.

GUIMARÃES, I. C.; DOS REIS, K. C.; MENEZES, E. G. T.; RODRIGUES, A. C.; DA SILVA, T. F.; DE OLIVEIRA, I. R. N.; VILAS BOAS, E. V. de B. Cellulose microfibrillated suspension of carrots obtained by mechanical defibrillation and their application in edible starch films. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 89, p. 285–294, 2016.

GUO, K.; GUAN, Q.; XU, J.; TAN, W. Mechanism of Preparation of Platform Compounds from Lignocellulosic Biomass Liquefaction Catalyzed by Bronsted Acid: A Review. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 202–213, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.12162/jbb.v4i4.009>.

HAKKARAINEN, T.; KOIVUNIEMI, R.; KOSONEN, M.; ESCOBEDO-LUCEA, C.; SANZ-GARCIA, A.; VUOLA, J.; VALTONEN, J.; TAMMELA, P.; MÄKITIE, A.; LUUKKO, K.; YLIPERTTULA, M.; KAVOLA, H. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 244, p. 292–301, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.053>.

HALLIWELL, B.; ZENTELLA, A.; GOMEZ, E. O.; KERSHENOBICH, D. Antioxidants and human disease: A general introduction. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 55, n. 1 II, p. S44–S49, 1997.

HAMMAM, W. E.; GAD, A. M.; GAD, M. K.; KIROLLOS, F. N.; YASSIN, E. N. *Pyrus communis* L. (Pear) and *Malus domestica* Borkh. (apple) leaves lipoidal extracts as sources for beta-sitosterol rich formulae and their wound healing evaluation. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 37, n. 15, p. 2613–2617, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2056181>.

HANNAN, M. A.; SOHAG, A. A. M.; DASH, R.; HAQUE, M. N.; MOHIBBULLAH, M.; OKTAVIANI, D. F.; HOSSAIN, M. T.; CHOI, H. J.; MOON, I. S. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 69, n. February, p. 153201, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153201>.

HE, Y.; WANG, B.; WEN, L.; WANG, F.; YU, H.; CHEN, D.; SU, X.; ZHANG, C. Effects of dietary fiber on human health. **Food Science and Human Wellness**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2022.

HENRÍQUEZ, C.; ESCOBAR, B.; FIGUEROLA, F.; CHIFFELLE, I.; SPEISKY, H.; ESTÉVEZ, A. M. Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 592–601, 2008. HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J.; LUCIA, L. A.; SAIN, M. Cellulosic nanocomposites: A review. **International Journal of Interactive Mobile Technologies**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 929–980, 2018.

ISO 10993-5 (2009) BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES. PART 5: TESTS FOR IN VITRO CYTOTOXICITY. In: [s. d.], [s. l.], . **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], [s. d.]. ISO 14855-1. International Standard International Standard. **61010-1** © **iec:2001**, [s. l.], v. 2003, p. 13, 2003.

KARASU, S.; TOKER, O. S.; YILMAZ, M. T.; KARAMAN, S.; DERTLI, E. Thermal loop test to determine structural changes and thermal stability of creamed honey: Rheological characterization. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 150, p. 90–98, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.004>.

KOEHNLEIN, E. A.; ELISE SANTOS CARVAJAL, A.; MARCELA KOEHNLEIN, E.; COELHO-MOREIRA, J. da S.; DORNELES INÁCIO, F.; CASTOLDI, R.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, [s. l.], v. 6, n. 21, p. 512–518, 2012.

KRISHNAN, A. K.; THOMAS, S. Recent advances on herb-derived constituents-

incorporated wound-dressing materials: A review. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 823–838, 2019.

KUMODE, M. M. N.; BOLZON, G. I. M.; MAGALHÃES, W. L. E.; KESTUR, S. G. Microfibrillated nanocellulose from balsa tree as potential reinforcement in the preparation of 'green' composites with castor seed cake. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 149, p. 1157–1163, 2017.

LAUREANTI, E. J. G.; PAIVA, T. S.; DE SOUZA TASSO, I.; DALLABONA, I. D.; HELM, C. V.; DE MATOS JORGE, L. M.; JORGE, R. M. M. Development of active cassava starch films reinforced with waste from industrial wine production and enriched with pink pepper extract. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 138, n. 36, p. 1–16, 2021.

LI, L.; FANG, J. D. Myo-inositol supplementation for the prevention of gestational diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 273, n. March, p. 38–43, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2022.04.009>.

LIMA, G. G.; CHEE, B. S.; MORITZ, V. F.; CORTESE, Y. J.; MAGALHÃES, W. L. E.; DEVINE, D. M.; NUGENT, M. J. D. The production of a novel poly(vinyl alcohol) hydrogel cryogenic spheres for immediate release using a droplet system. **Biomedical Physics and Engineering Express**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2019.

LIMA; DE MIRANDA, N. B.; TIMM, T. G.; MATOS, M.; ANGELINA MORAES DE LIMA, T.; LUIZ ESTEVES MAGALHAES, W.; BENATHAR BALLOD TAVARES, L.; HANSEL, F. A.; HELM, C. V. Characterisation and: In vivo evaluation of *Araucaria angustifolia* pinhão seed coat nanosuspension as a functional food source. **Food and Function**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 9820–9832, 2020.

LIMA, T. A. D. M. De; LIMA, G. G. De; CHEE, B. S.; HENN, J. G.; CORTESE, Y. J.; MATOS, M.; HELM, C. V.; MAGALH, W. L. E.; NUGENT, M. J. D. Characterization of Gels and Films Produced from Pinhã o Seed Coat Nanocellulose as a Potential Use for Wound Healing Dressings and Screening of Its Compounds towards. [s. l.], 2022.

LING, Z.; GUO, Z.; HUANG, C.; YAO, L.; XU, F. Deconstruction of oriented crystalline cellulose by novel levulinic acid based deep eutectic solvents pretreatment for improved enzymatic accessibility. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 305, n. February, p. 123025, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123025>.

LIU, X.; WANG, Y.; YU, L.; TONG, Z.; CHEN, L.; LIU, H.; LI, X. Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. **Starch/Staerke**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 48–60, 2013.

LUO, C.; REN, H.; YAO, X.; SHI, Z.; LIANG, F.; KANG, J. X.; WAN, J. bo; PEI, Z.; SU, K. P.; SU, H. Enriched Brain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Confer Neuroprotection against Microinfarction. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 32, p. 50–61, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.028>.

MENG, Z.; ZHAO, J.; DUAN, H.; GUAN, Y.; ZHAO, L. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from Pollen Typhae by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 161, p. 246–253, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.048>.

MIKOŁAJCZAK, N.; TAŃSKA, M.; OGRODOWSKA, D. Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 113, n. April, p. 110–138, 2021.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical science (London, England : 1979)**, Englandv. 84, n. 4, p. 407–412, 1993.

MOLONIA, M. S.; OCCHIUTO, C.; MUSCARÀ, C.; SPECIALE, A.; RUBERTO, G.; SIRACUSA, L.; CRISTANI, M.; SAIJA, A.; CIMINO, F. Effects of a pinitol-rich Glycyrrhiza glabra L. leaf extract on insulin and inflammatory signaling pathways in palmitate-induced hypertrophic adipocytes. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2010073>.

MORGANTI, P.; YUDIN, V. E.; MORGANTI, G.; COLTELLI, M.-B. Trends in Surgical and Beauty Masks for a Cleaner Environment. **Cosmetics**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-9284/7/3/68>.

NAKANO, E.; KAMEI, D.; MURASE, R.; TAKI, I.; KARASAWA, K.; FUKUHARA, K.; IWAI, S. Anti-inflammatory effects of new catechin derivatives in a hapten-induced mouse contact dermatitis model. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 845, n. December 2018, p. 40–47, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.12.036>.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. **Dissertação de Mestrado**, [s. l.], p. 109, 2013.

OLIVEIRA, A.; MOREIRA, T. F. M.; PEPINELLI, A. L. S.; COSTA, L. G. M. A.; LEAL, L. E.; DA SILVA, T. B. V.; GONÇALVES, O. H.; PORTO INEU, R.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; ABREU, R. M. V.; FERREIRA, I. C. F. R.; BRACHT, L.; LEIMANN, F. V. Bioactivity screening of pinhão (*Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze) seed extracts: The inhibition of cholinesterases and α -amylases, and cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Food and Function**, [s. l.], v. 12, n. 20, p. 9820–9828, 2021.

ORTIZ, C. M.; SALGADO, P. R.; DUFRESNE, A.; MAURI, A. N. Microfibrillated cellulose addition improved the physicochemical and bioactive properties of biodegradable films

based on soy protein and clove essential oil. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 79, p. 416–427, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.011>.

PÄÄKKO, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTRÖM, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.

PATOARY, M. K.; FAROOQ, A.; YINAN, F.; CHAUDARY, A.; ISLAM, S. R.; ZHAO, Y.; GE, A.; WANG, F.; LIU, L. Structure and rheological studies of phosphorylated cellulose nanofibrils suspensions. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 178, n. January, p. 114581, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114581>.

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

PEREIRA, P. H. F.; ORNAGHI, H. L.; ARANTES, V.; CIOFFI, M. O. H. Effect of chemical treatment of pineapple crown fiber in the production, chemical composition, crystalline structure, thermal stability and thermal degradation kinetic properties of cellulosic materials. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 499, n. November 2020, 2021.

PHANTHONG, P.; REUBROYCHAROEN, P.; HAO, X.; XU, G.; ABUDULA, A.; GUAN, G. Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 32–43, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>.

PIRICH, C. L.; PICHETH, G. F.; MACHADO, J. P. E.; SAKAKIBARA, C. N.; MARTIN, A. A.; DE FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R. Influence of mechanical pretreatment to isolate cellulose nanocrystals by sulfuric acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 130, p. 622–626, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.166>.

PUGALENDI, R. H. and K. V. ANTIHYPERGLYCEMIC EFFECT OF PROTOCATECHUIC ACID ON STREPTOZOTOCIN- DIABETIC RATS Ranganathan Harini and Kodukkur Viswanathan Pugalendi. **Journal of Basic Clinical Physiological and Pharmacology**, [s. l.], v. 21, p. 79–92, 2010.

QI, X.; TESTER, R. F. Fructose, galactose and glucose – In health and disease. **Clinical Nutrition ESPEN**, [s. l.], v. 33, p. 18–28, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.07.004>.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18

non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>.

RYU, D. Y.; KWON, S. C.; KIM, J. Y.; HUR, W. Maintenance of viability and proliferation of 3T3 cell aggregates incorporating fibroin microspheres into cultures. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 579–587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00408-5>.

SANT'ANNA, V.; SFOGLIA, N. M.; MERCALI, G. D.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Effect of cooking on polyphenols and antioxidant activity of *Araucaria angustifolia* seed coat and evaluation of phytochemical and microbiological stability over storage. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 8, p. 1932–1936, 2016.

SANTOS, C. H. K.; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; BONA, E.; DA SILVA, M. V.; LEIMANN, F. V. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*Araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 261, n. February, p. 216–223, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.057>.

SANYANG, M. L.; SAPUAN, S. M.; JAWAID, M.; ISHAK, M. R.; SAHARI, J. Effect of plasticizer type and concentration on tensile, thermal and barrier properties of biodegradable films based on sugar palm (*Arenga pinnata*) starch. **Polymers**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 1106–1124, 2015.

SCHURZ, J. **Rheological Methods**. [S. l.: s. n.], 1967. 1967.

SERPA GUERRA, A. M.; GÓMEZ HOYOS, C.; VELÁSQUEZ-COCK, J. A.; VÉLEZ PENAGOS, L.; GAÑÁN ROJO, P.; VÉLEZ ACOSTA, L.; PEREIRA, M. A.; ZULUAGA, R. Effect of ultra-fine friction grinding on the physical and chemical properties of curcuma (*Curcuma longa* L.) suspensions. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 132–142, 2020.

SHAH, M.; BASHIR, S.; JAAN, S.; NAWAZ, H.; NISHAN, U.; ABBASI, S. W.; JAMAL, S. B.; KHAN, A.; AFRIDI, S. G.; IQBAL, A. Computational Analysis of Plant-Derived Terpenes as α -glucosidase Inhibitors for the Discovery of Therapeutic Agents against Type 2 Diabetes Mellitus. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 143, p. 462–473, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.09.030>.

SHAH, B. R.; LI, B.; AL SABBAH, H.; XU, W.; MRÁZ, J. Effects of prebiotic dietary fibers and probiotics on human health: With special focus on recent advancement in their encapsulated formulations. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 102, n. June, p. 178–192, 2020.

SILVA-RODRIGUES, H. C.; SILVEIRA, M. P.; HELM, C. V.; DE MATOS JORGE, L. M.;

JORGE, R. M. M. Gluten free edible film based on rice flour reinforced by guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) pulp. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 137, n. 41, p. 1–11, 2020.

SILVA, F. K. de S.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FERNANDES, M. A.; PEGORIN BRASIL, G. S.; MUSSAGY, C. U.; SCONTRI, M.; DA SILVA SASAKI, J. C.; DE SOUSA ABREU, A. P.; GUERRA, N. B.; FLORIANO, J. F.; DE MENDONÇA, R. J.; CAETANO, G. F.; FARHADI, N.; GÓMEZ, A.; HUANG, S.; FARIAS, A. M.; PRIMO, F. L.; LI, B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; DOKMECI, M. R.; JUCAUD, V.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; CARDOSO, M. R.; HERCULANO, R. D. Biocompatible anti-aging face mask prepared with curcumin and natural rubber with antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 242, p. 124778, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813023016720>.

SILVA, T. B. V.; MOREIRA, T. F. M.; DE OLIVEIRA, A.; BILCK, A. P.; GONÇALVES, O. H.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; YAMASHITA, F.; SHIRAI, M. A.; LEIMANN, F. V. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. **Food and Function**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 7697–7706, 2019.

SILVA, C.; ZANQUI, A. B.; SOUZA, A. H. P.; GOHARA, A. K.; GOMES, S. T. M.; SILVA, E. A. Da; FILHO, L. C.; MATSUSHITA, M. Extraction of oil and bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze using subcritical n-propane and organic solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 112, p. 14–21, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.003>.

SIM, Y. Y.; NYAM, K. L. Application of Hibiscus cannabinus L. (kenaf) leaves extract as skin whitening and anti-aging agents in natural cosmetic prototype. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 167, n. 1, 2021.

SINGLETON, V. .; ROSSI, J. . Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOUZA, M. O.; BRANCO, C. S.; SENE, J.; DALLAGNOL, R.; AGOSTINI, F.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Antioxidant and antigenotoxic activities of the Brazilian pine araucaria angustifolia (Bert.) o. kuntze. **Antioxidants**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 24–37, 2014.

SOUZA, L. O.; LESSA, O. A.; DIAS, M. C.; TONOLI, G. H. D.; REZENDE, D. V. B.; MARTINS, M. A.; NEVES, I. C. O.; DE RESENDE, J. V.; CARVALHO, E. E. N.; DE BARROS VILAS BOAS, E. V.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Study of morphological properties and rheological parameters of cellulose nanofibrils of cocoa shell (*Theobroma cacao* L.). **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 214, n. March, p. 152–158, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.037>.

SPADA, J. C.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C. Potential of pinhão Coat as Constituents of Starch Based Films Using Modification Techniques. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 2686–2697, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-017-1158-3>.

SPEROTTO, N. D. de M.; STEFFENS, L.; VERÍSSIMO, R. M.; HENN, J. G.; PÉRES, V. F.; VIANNA, P.; CHIES, J. A. B.; ROEHE, A.; SAFFI, J.; MOURA, D. J. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 225, n. July, p. 178–188, 2018.

SU, X.; LIU, X.; WANG, S.; LI, B.; PAN, T.; LIU, D.; WANG, F.; DIAO, Y.; LI, K. Wound-healing promoting effect of total tannins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in rats. **Burns**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 830–838, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2016.10.010>.

SUGANUMA, M.; SAHA, A.; FUJIKI, H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. **Cancer Science**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 317–323, 2011.

TIMM, T. G.; DE LIMA, G. G.; MATOS, M.; MAGALHÃES, W. L. E.; TAVARES, L. B. B.; HELM, C. V. Nanosuspension of pinhão seed coat development for a new high-functional cereal bar. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1–10, 2020.

TORRES, F. G.; TRONCOSO, O. P.; GRANDE, C. G.; DÍAZ, D. A. Biocompatibility of starch-based films from starch of Andean crops for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1737–1740, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.08.004>.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, [s. l.], v. 189, n. 1–2, p. 41–54, 2003.

USDA/DHHS. Dietary Guidelines for Americans by U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture __. **[Monograph on the Internet]**, [s. l.], v. 6th Editio, n. Available at: <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/>, p. Accessed June 7, 2007, 2005.

VU, H. P.; NGUYEN, L. N.; VU, M. T.; HASAN, A.; MCLAUGHLAN, R.; NGHIEM, L. D. Science of the Total Environment A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biore fi nery feedstocks. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 743, p. 140630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140630>.

XIAO, F.; GUO, F. Impacts of essential amino acids on energy balance. **Molecular**

Metabolism, [s. l.], v. 57, n. November 2021, p. 101393, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101393>.

YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, [s. l.], v. 86, n. 12–13, p. 1781–1788, 2007.

ZAIN, M. S. C.; LEE, S. Y.; SARIAN, M. N.; FAKURAZI, S.; SHAARI, K. In vitro wound healing potential of flavonoid c-glycosides from oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.) leaves on 3t3 fibroblast cells. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2020.

ZHANG, Q.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Protocatechuic acid attenuates adipogenesis-induced inflammation and mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes by regulation of AMPK pathway. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 69, n. April, p. 103972, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103972>.

ZHAO, J.; XU, Y.; WANG, W.; GRIFFIN, J.; ROOZEBOOM, K.; WANG, D. Bioconversion of industrial hemp biomass for bioethanol production: A review. **Fuel**, [s. l.], v. 281, p. 118725, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001623612031721X>.

ZHOU, P.; TANG, D.; ZOU, J.; WANG, X. An alternative strategy for enhancing stability and antimicrobial activity of catechins by natural deep eutectic solvents. **Lwt**, [s. l.], v. 153, n. August 2021, p. 112558, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112558>.

ZHOU, L.; WANG, Y.; HU, X.; WU, J.; LIAO, X. Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 321–327, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.01.002>.

ZORTÉA-GUIDOLIN, M. E. B.; DEMIATE, I. M.; GODOY, R. C. B. de; SCHEER, A. de P.; GREWELL, D.; JANE, J. lin. Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 63, p. 19–26, 2017.