

Avaliação da atividade biológica de extratos do pinhão

Biological activity evaluation from pine nut extract

RESUMO

Luis Gustavo Médice Arabel Costa
luiscosta@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Fernanda Vitória Leimann
fernandaleimann@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Lívia Bracht
liviabracht@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Luana Eloísa Leal
luheloleal@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Anielle de Oliveira
ani.028@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Thaysa Fernandes Moya Moreira
Thaysa.moya@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



Alguns estudos indicam a presença de compostos fenólicos nas cascas e sementes do pinhão. A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica, caracterizada por altos níveis de glicose no sangue. Uma possível solução para os efeitos negativos causados pela hiperglicemia é a inibição das enzimas hidrolisantes de carboidratos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos de pinhão (água de cozimento-AC e etanólico da casca-CP) na atividade das enzimas alfa-amilase salivar humana e pancreática suína por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Os extratos foram caracterizados com relação às propriedades térmicas, grupos funcionais moleculares e capacidade antioxidante. Foram avaliados os efeitos da presença dos extratos na atividade das enzimas alfa-amilases. Os resultados de IC50 obtidos para inibição da alfa-amilase salivar foram de 740 e 129 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para pancreática suína de 1871,66 e 460,70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para AC e CP, respectivamente. Nos ensaios *in vivo*, o extrato AC apresentou redução de até 17% que o grupo controle, e o extrato CP de até 56% na glicemia dos animais. Portanto, os extratos agiram como inibidores das enzimas, contudo o extrato da casca apresenta maior potencial de aplicação em estudos futuros para o tratamento de doenças, como Diabetes.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes. Alfa-Amilase. Antioxidantes.

ABSTRACT

Some studies indicate the presence of phenolic compounds in pinhão seeds and seed shells. Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disease, characterized by high blood glucose levels. A possible solution to the negative effects caused by hyperglycemia is the inhibition of the carbohydrate hydrolyzers enzymes. Thus, this work's objective was to evaluate the effect of pinhão extracts (cooking water-AC and ethanolic shells extract-CP) in the activity of human salivary and swine pancreatic alpha-amylase enzymes by means of *in vitro* and *in vivo* tests. The extracts were characterized with respect to thermal properties, molecular functional groups and antioxidant capacity. The IC50 results obtained for inhibition of salivary alpha-amylases were 740 and 129 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and for porcine pancreatics of 1871.66 and 460.70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for AC and CP, respectively. In *in vivo* tests, the AC extract showed a reduction up to 17% than the control group, and CP extract up to 56% in the animals' glycemia. Therefore, extracts acted as enzyme inhibitors, however the shell extract has greater application potential in future studies for the treatment of diseases such as diabetes.

KEYWORDS: Diabetes. Alpha-Amylase. Antioxidants.



INTRODUÇÃO

Em inúmeros estudos, a acumulação de espécies reativas de oxigênio no organismo humano tem sido associada como a causa de algumas doenças como, as neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer e diabetes. Logo a pesquisa por fontes de antioxidantes tem se tornado o foco de muitos pesquisadores, tendo em vista que estas são responsáveis pela redução do estresse oxidativo, minimizando as reações em cadeia de radicais livres (ESTEVINHO et al., 2013).

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica que possui como principal característica a deficiência na secreção de insulina, resultando assim em altos níveis de glicose no sangue. As consequências adversas advindas de algumas drogas sintéticas já presentes em mercado, tem aumentado a procura por compostos alternativos (AMARANTE et al., 2007).

Os tratamentos convencionais já existentes incluem a redução da demanda por insulina, a estimulação da secreção endógena da insulina, o aprimoramento da sua ação nos tecidos alvos e a inibição da degradação de oligo e dissacarídeos (FUNKE et al., 2006). Isto pode ser conseguido através da inibição das enzimas hidrolisantes de carboidratos, tal como alfa-amilase (NAMJOYAM et al., 2015).

Estudos recentes, elaborados a partir da caracterização do extrato aquoso do pinhão, apontam que este apresenta uma quantidade expressiva de compostos fenólicos (DAUDT et al., 2016). Pesquisadores aplicaram o extrato proveniente da casca do pinhão (70% de etanol em água) como inibidor da alfa-amilase, possibilitando observar a riqueza da composição de taninos do extrato em procianidinas, considerado um eficaz inibidor da enzima alfa-amilase salivar humana e pancreática suína (DA SILVA et al., 2013).

Assim, a proposta desse trabalho é a obtenção dos extratos dos resíduos do pinhão, para a avaliação da atividade antioxidante e do efeito inibitório das enzimas alfa-amilase salivar humana e pancreática suína, com o intuito de futura aplicação destes extratos em alimentos como inibidores naturais destas enzimas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na obtenção dos compostos antioxidantes do extrato da casca do pinhão, fora utilizado Álcool Etílico (Dinâmica, Brasil). Para a análise de capacidade antioxidante do extrato, fora utilizado o radical DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil, Sigma-Aldrich) e metanol (Dinâmica). Na realização dos testes para a inibição das enzimas alfa-amilase, foi utilizado as enzimas salivar humana (Tipo IXA, 87,5 unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich) e pancreática suína (Tipo VI-B, ≥ 10 unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich), amido de batata (Sigma-Aldrich), tartarato de sódio (Alphatec), hidróxido de sódio (Isofar), ácido (3,5) dinitrosalicílico (Inlab), cloreto de cálcio (Proquímicos), fosfato de sódio (Vetec) e tris (Dinâmica).

O extrato da água do cozimento do pinhão fora obtido conforme a metodologia descrita por De Freitas et al. (2018). Após a obtenção do pinhão cozido (500 g.L⁻¹ de água, 2 horas em ebulição), a água proveniente deste, fora filtrada e posteriormente levada ao rotaevaporador a 90 °C. Por fim, fora congelada no ultrafreezer (Liotop) a -80 °C e finalizando o processo, sendo liofilizada.

Para a obtenção do extrato do pinhão a partir da casca residual, realizou-se a secagem da casca em uma estufa a 60 °C durante 24 h, posteriormente, foram levadas a um moinho de facas (SOLAB), para serem trituradas. Consequente, fora preparada uma solução com 200mL de etanol absoluto adicionando 17,5 g das cascas trituradas seguido da agitação em ultraturrax (Ika, T25) durante 15 minutos a 12.000 rpm. Por fim, a solução obtida fora filtrada por uma bomba à vácuo, sendo levada a uma estufa a 50 °C até a completa evaporação do solvente.

A caracterização térmica de aproximadamente 10 mg de amostra do extrato obtido, foi realizada a partir de um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer, 4000). As rampas de aquecimento foram configuradas para 0 a 350 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ sob fluxo de nitrogênio gasoso (20mL.min⁻¹).

Para a determinação das características moleculares dos extratos realizou-se o ensaio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Foram triturados aproximadamente 10 mg de amostra com 0,2 g de brometo de potássio (KBr), para formar a pastilha. As pastilhas foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf.cm⁻² de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). A leitura do espectro fora realizada em um FTIR (IR AFFINITY-1, Shimadzu) na faixa de 4000 a 500 cm⁻¹ de comprimento de onda, utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm⁻¹. As bandas foram normalizadas para comparação dos espectros.

Com poucas alterações, a avaliação de atividade antioxidante do extrato fora feita seguindo a metodologia por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), utilizando como radical livre o DPPH. O experimento fora realizado em triplicata, adicionando 50 µL de extrato (diluído em etanol, 8 mg. mL⁻¹) em 1.950 µL de solução metanólica de DPPH 60 µmol.L⁻¹ em um tubo de ensaio, e 50 µL de etanol em 1.950 µL de DPPH em outro (controle negativo). Os tubos então foram armazenados de forma a evitar a luz do ambiente, mantendo-as assim por 30 minutos. Por fim, foram feitas as leituras das absorbâncias em um espectrofotômetro (USB650UV, OceanOptics), no comprimento de onda de 517 nm, utilizando como branco o metanol. Os resultados finais foram obtidos por meio da curva de calibração de trolox ($y = 0,0905 x + 0,8656$) e expressos em µmol equivalente de trolox por 100 g de extrato.

A avaliação de inibição enzimática fora feita através dos testes *in vitro* e *in vivo*. Realizou-se o teste *in vitro*, de acordo com a metodologia proposta por Da Silva et al. (2014), com algumas modificações. A alfa-amilase pancreática (suína) e a alfa-amilase salivar humana, foram solubilizadas em 40mmol.L⁻¹ de tampão fosfato e 13,4 mmol.L⁻¹ de NaCl, com pH de 6,9. O amido de batata, fora utilizado como substrato para esta avaliação, formando assim uma solução de 1% em água. Para a avaliação do extrato do pinhão enquanto inibidor, estes foram avaliados em concentrações finais de 2000, 1600, 1200, 800, 80 e 20 µg.mL⁻¹. A reação fora iniciada com a adição da enzima. A concentração de enzima adicionada a cada sistema de reação foi de 74 U.mL⁻¹ para ambas. A reação foi mantida por 15 minutos, em um banho com temperatura controlada a 37 °C. Os açúcares redutores produzidos pela hidrólise de amido foram mensurados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) MILLER (1959). O grupo aldeído de açúcares redutores converte o ácido 3,5 dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que é a forma reduzida de DNS. A formação de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico

origina uma alteração na quantidade de luz absorvida, em comprimento de onda de 540 nm. A absorvância medida usando um espectrofotômetro é diretamente proporcional a quantidade de açúcar redutor. O método de interpolação numérica com a equação de Stineman (WAGON, 1999), possibilitou que as avaliações de inibição enzimática fossem realizadas. Para o cálculo, fora utilizado o software Scientist da MicroMath Scientific Software (Salt Lake City, UT, USA).

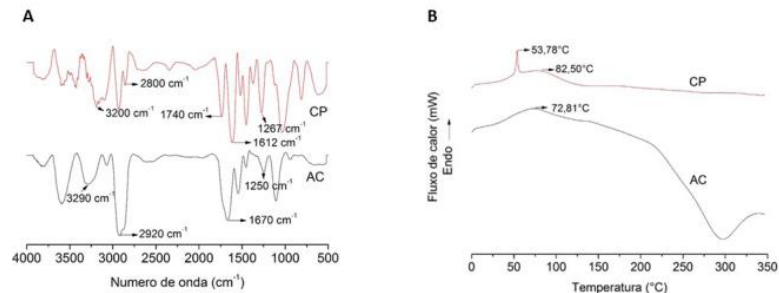
Para a avaliação da inibição enzimática *in vivo*, o trabalho fora submetido e aceito pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob número de protocolo 2935011018. Os extratos foram administrados em Wistar de acordo com a metodologia proposta por Da Silva et al. (2014). Os ratos foram divididos em 5 grupos, de maneira a obter 7 ratos por grupo. O grupo I, fora estabelecido como o grupo controle, este fora submetido ao amido de milho comercial (1 g.Kg^{-1} de peso corporal) que foi administrado via gavagem. O grupo II fora submetido a acarbose (50 mg.Kg^{-1}). Os grupos III, IV e V foram submetidos ao extrato AC, nas concentrações de 100, 250 e 500 mg.kg^{-1} , respectivamente. O mesmo procedimento foi realizado para a avaliação do extrato CP. Por fim, as leituras de níveis de glicose no sangue foram feitas em intervalos de 15 minutos, começando 15 minutos após a realização da gavagem. As amostras de sangue do animal foram analisadas por meio de um glicosímetro (Accu-Check® Active). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste t-Student a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$) por meio do programa Statistic 7.0 (Statsoft, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

É evidente (Figura 1 – B) a presença de picos endotérmicos próximos a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, pode-se relacionar essa transição com a evaporação da água (DO PRADO SILVA et al., 2017). Nota-se também, um pico bem definido na amostra CP observando assim uma temperatura de aproximadamente $54 \text{ }^\circ\text{C}$, que possivelmente está relacionada com a temperatura de gelatinização do amido residual da semente, relatada em outros estudos (CASTAÑO et al., 2016; ZORTÉA-GUIDOLIN et al., 2017) ou com a presença de terpenóides que é característica de coníferas como a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (PEROTTI et al., 2015; YAMAMOTO, 2004). De acordo com Tsanaktsidis et al. (2013) a Tg da resina de *Pinus halepensi* está localizada em $37 \text{ }^\circ\text{C}$, no entanto, não foram encontrados dados de caracterização térmica da resina obtida a partir da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. Ainda, dentro da faixa estudada não houve degradação térmica dos extratos. Em 1612 cm^{-1} observa-se uma banda de maior intensidade da amostra CP, que está relacionada ao grupamento C = C da catequina (RAMOS-TEJADA et al., 2002). Para mais, a banda referente a ligação C = O localiza-se em 1740 cm^{-1} e em 1670 cm^{-1} para as amostras CP e AC, respectivamente. De acordo com Ricci (2015), a vibração relacionada ao estiramento C = O foi identificada por diversos autores, que analisaram monômeros fenólicos de taninos por FTIR, na região entre 1638 cm^{-1} e 1770 cm^{-1} . Em 2920 e 2800 cm^{-1} encontram-se as bandas do estiramento CH_2 (RICCI et al., 2015). Ainda, observa-se a presença da banda característica do estiramento -OH, em 3290 e 3200 cm^{-1} para AC e CP, respectivamente. De acordo com Ricci et al. (2015) a forma da banda do estiramento -OH fornece informações preliminares sobre a ocorrência de um processo de polimerização. Taninos naturais exibem uma distribuição de graus de polimerização que variam de monômeros simples a

oligômeros, a frações com alto grau de polimerização, o que resulta em uma banda larga distribuída sobre o espectro na região de 3700 a 3000 cm^{-1} .

Figura 1 – (A) Termogramas de DSC para os extratos provenientes da água do cozimento do pinhão (AC) e da casca do pinhão (CP). (B) Espectros de FTIR para os extratos AC e CP.



Fonte: O Autor (2019)

Uma banda larga para o estiramento -OH em taninos é consequência de uma sobreposição de bandas decorrentes de substituintes OH em diferentes posições, em moléculas com diferentes graus de polimerização, e de múltiplas interações das moléculas com um substrato específico. No espectro da amostra CP a banda localizada em 1267 cm^{-1} refere-se à deformação no plano de C-OH (*bending*) em polifenóis (DA SILVA et al., 2014) sendo mais evidente que a da amostra AC, além desta última apresentar posição diferente (1250 cm^{-1}). Este resultado deve estar relacionado com a maior quantidade de compostos que apresentam a ligação C-OH no extrato CP devido à polaridade do solvente utilizado na extração.

Tabela 1 - Análise antioxidante dos extratos pelo método de DPPH

Método	Extrato AC ($\mu\text{molET.100gextrato}^{-1}$ *)	Extrato CP ($\mu\text{molET.100gextrato}^{-1}$)
DPPH	6987,11 ^a ± 170,02	12937,34 ^b ± 12,45

Fonte: o Autor (2019).

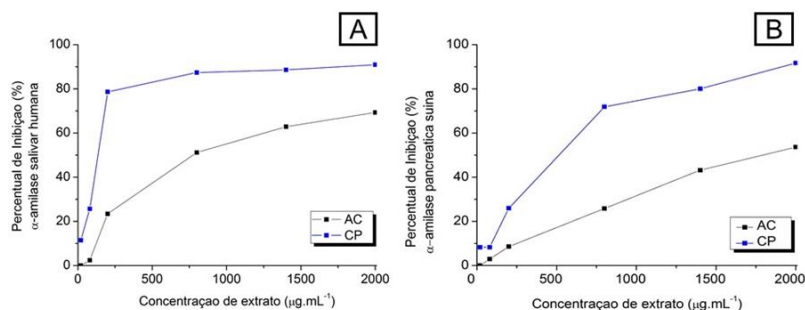
^{a,b}As médias das amostras acompanhadas pela mesma letra, na mesma linha (minúsculo) e não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste t-Student.

Em relação ao extrato AC, CP apresentou uma capacidade de aproximadamente 18 vezes maior de ação antioxidante. Este resultado demonstra que mesmo após a cocção, a maioria dos compostos antioxidantes, continuam presentes na casca o que difere da água do cozimento. De Freitas et al. (2018) avaliaram a capacidade antioxidante da água do cozimento do pinhão pelo método de DPPH e obtiveram um valor de 11,78 $\mu\text{molET.g}^{-1}$ de extrato, aproximadamente 6 vezes menor que o obtido no presente trabalho. Essa diferença pode estar relacionada com a diversidade do local de cultivo das espécies, tempo de maturação, entre outros fatores (VIEIRA et al., 2019). Mota et al. (2014) analisaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos da casca e da semente do pinhão pelos métodos de DPPH, ABTS e ORAC, observaram que o extrato da casca demonstrou capacidade antioxidante superior ao da semente e ainda, identificaram a presença de moléculas que possuem a capacidade de sequestrar os radicais livres.

Observa-se na Figura 2 que o comportamento de inibição para os extratos é semelhante, tanto para a amilase salivar, quanto pancreática. Ainda, o extrato CP

obteve maior inibição enzimática, alcançando percentuais de inibição próximos a 100% na maior concentração testada (2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Figura 2 - Percentual de inibição das alfa-amilases em testes *in vitro* pela presença dos extratos AC e CP: (A) Alfa-amilase salivar humana e (B) Alfa-amilase pancreática suína



Fonte: O autor (2019).

Tabela 2 - Média \pm desvio padrão dos valores de concentração de extratos para a inibição de 50% da atividade das alfa-amilases (IC50, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

	IC50($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Água do cozimento do pinhão (AC)	IC50($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Extrato da casca do pinhão CP
Amilase salivar	740,00 \pm 34,64	129,00 \pm 11,53
Amilase pancreática	1871,66 \pm 174,81	460,70 \pm 88,90

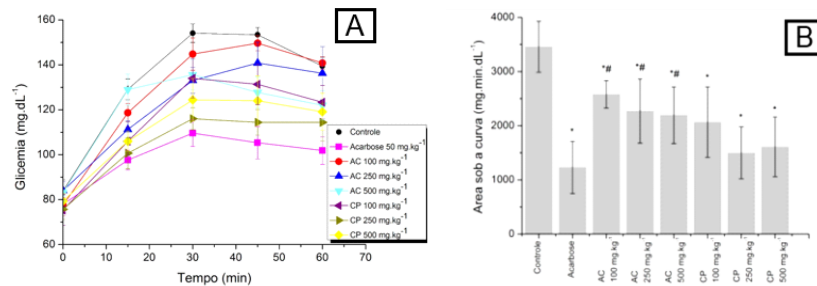
Fonte: O Autor (2019).

Nos testes *in vitro* observa-se que ambas as enzimas foram inibidas mais efetivamente por CP comparando a AC. De fato, pode ser verificado que o extrato CP apresentou valores de IC50 aproximadamente 4 vezes menores que AC. Este efeito está provavelmente relacionado à diferença de concentração dos compostos bioativos. O IC50 do CP é 3,5 vezes maior para a enzima pancreática quando comparado com a salivar, e para o extrato AC, a relação entre os valores de IC50 é de 2,5. Da Silva et al. (2014) analisaram o extrato da casca do pinhão (extrato etanólico 70%, purificado por cromatografia de exclusão molecular) concluíram que esse demonstrou um efeito inibitório eficiente nas atividades das enzimas alfa-amilase salivar humana e pancreática suína, estando de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho.

Para a análise *in vivo* o grupo controle apresentou maior índice glicêmico. O pico da glicemia nos animais deste grupo ($154 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ocorreu aos 30 minutos após a ingestão do amido, apresentando decréscimo na curva aos 45 minutos. A acarbose diminuiu a glicemia dos animais de forma eficaz, sendo que, 30 minutos após ingestão do amido (Figura 4 - A), esta glicemia foi 30% menor em relação ao controle ($p < 0,05$). Ainda, em relação ao total de glicose absorvida em 1 hora após a ingestão de amido (área sobre a curva, Figura 4 - B) nota-se que houve uma diminuição de 64%. O extrato AC fora capaz de diminuir significativamente a glicemia dos animais, entretanto, este fora menos eficiente que a acarbose. Aos 30 minutos após a ingestão de amido (Figura 4 - A), a glicemia dos animais tratados com o extrato foi de até 18% menor do que o controle ($p < 0,05$) para a concentração de $250 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Ao analisar o índice glicêmico em 1 hora (Figura 4 - A), a administração do extrato AC resultou em uma diminuição de até 36% na glicemia dos animais, para a concentração de $500 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Estes resultados

apontam para uma tendência de relação dose-dependente, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre as diferentes doses testadas. Os resultados de CP não diferiram significativamente dos resultados da acarbose, demonstrando uma diminuição de até 56% no total de glicose absorvida pelos animais para a concentração de 250 mg.kg⁻¹ de extrato, quando comparado ao grupo controle. Portanto, esses resultados comprovam a análise *in vitro*.

Figura 3 – (A) Análise *in vivo* da inibição da α -amilase pela presença do extrato proveniente da água do cozimento (AC) e da casca do pinhão (CP) e (B) Área sob a curva da análise *in vivo*.



Fonte: Autoria própria (2019).

*Diferença significativa do controle ($p < 0,05$); #Diferença significativa do grupo acarbose ($p < 0,01$); $n = 5$ a 7 animais por grupo.

CONCLUSÃO

Os extratos AC e CP, mostraram através do teste de DPPH que possuem propriedades antioxidantes significativas, e possivelmente podem atuar no controle da formação de espécies reativas do oxigênio e na diminuição da oxidação lipídica, no organismo humano.

Os testes *in vitro* possibilitaram a observação de que ambos os extratos possuem capacidade de inibição enzimática, para as enzimas alfa-amilases. Entretanto, o extrato CP, mostrou maior poder inibitório destas enzimas, quando comparado com o extrato AC.

Os testes *in vivo* mostraram que os extratos, possuem propriedades inibitórias e podem auxiliar no combate à hiperglicemia, já que apresentaram uma redução da glicemia no sangue, quando comparados com o grupo controle. Assim, comprova-se que AC e CP provavelmente podem ser utilizados para minimizar os efeitos negativos da hiperglicemia em pacientes diabéticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica (PIBIC) e pelo financiamento do projeto (Chamada Universal MCTIC/CNPq n.º 28/2018, Processo n.º 421541/2018-0). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à Central Analítica Multiusuário da UTFPR Campo Mourão (CAMulti-CM) pelas análises.

REFERÊNCIAS

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm.-Wiss. u-Techno.**, v. 30, p. 25–30, 1995.

CASTAÑO, J. et al. Chemical composition and thermal properties of Chilean *Araucaria araucana* starch. **Starch/Staerke**, v. 68, p. 100–105, 2016.

DA SILVA, S. M. et al. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.

DAUDT, R. M. et al. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 573–580, 2015.

DAUDT, R. M. et al. Development of edible films based on Brazilian pine seed (*Araucaria angustifolia*) flour reinforced with husk powder. **Food hydrocolloids**, v. 71, p. 60–67, 2017.

DE FREITAS, T. B. et al. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, n. July 2017, p. 28–34, 2018.

DO PRADO SILVA, J.T. et al. Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice' s declarative memory. **Materials Science & Engineering C**, v. 76, p. 1005–1011, 2017.

FUNKE, I.; MELZIG, M. F. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 2006.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 3, p. 426–428, 1959.

MOTA, G. S. T. DA et al. Antioxidant Activity of Cosmetic Formulations Based on Novel Extracts from Seeds of Brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, p. 190–202, 2014.

PEROTTI, J. C.; DA SILVA RODRIGUES-CORRÊA, K. C.; FETT-NETO, A. G. Control of resin production in *Araucaria angustifolia*, an ancient South American conifer. **Plant Biology**, v. 17, n. 4, p. 852–859, 2015.

RAMOS-TEJADA, M. M. et al. Investigation of alumina/(+)-catechin system properties. Part I: A study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 24, n. 3–4, p. 297–308, 2002.

RICCI, A. et al. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 5, p. 407–442, 2015.

VIEIRA, T. F. et al. Chemometric Approach Using ComDim and PLS-DA for Discrimination and Classification of Commercial Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Food Analytical Methods**, 2019.

WAGON, S. **Mathematica in action**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 1999.

ZORTÉA-GUIDOLIN, M. E. B. et al. Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 19–26, 2017.