

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO

ANIELLE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia*  
(BERTOL.) KUNTZE**

DISSERTAÇÃO

CAMPO MOURÃO

2019

ANIELLE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia*  
(BERTOL.) KUNTZE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Campo Mourão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Vitória Leimann.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia Bracht.

CAMPO MOURÃO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M48a	<p>Oliveira , Anielle de.</p> <p>Avaliação da bioatividade de extratos de Araucária angustifolia (Bertol.) kuntze / Anielle de Oliveira – 2019. 45 f.: il.; 30 cm.</p> <p>Texto em português com resumo em inglês Orientadora: Fernanda Vitória Leimann Coorientador: Lívia Bracht. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2019. Inclui bibliografias.</p> <p>1. Pinhão 2. Colinesterases 3. Antioxidantes 4. Alimentos – Dissertações. I. Oliveira, Anielle de, orient. II. Bracht, Lívia, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.</p> <p>CDD: 664</p>
------	--

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos 9/1735



## TERMO DE APROVAÇÃO

### AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

Por

**ANIELLE DE OLIVEIRA**

Essa dissertação foi apresentada às 10 horas, do dia 17 de Setembro de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Prof. Dra. Fernanda Vitória Leimann (Orientador – PPGTA)

---

Prof. Dra. Lilian Brites Campos Shimada (Membro Externo – Integrado)

---

Prof. Dra. Andrea Luiza de Oliveira Valoto (Membro Externo – Integrado)

\* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meu caminho com os dons do Espírito Santo, me concedendo discernimento, saúde e força, sei que todas as escolhas, as dificuldades enfrentadas e as graças recebidas foram providências divinas.

Aos meus pais, Célia e Ivanir, que são o meu alicerce e não mediram esforços para que esse sonho pudesse se tornar realidade, a minha irmã Grazielle, por todos os conselhos e incentivo, e ao meu namorado, César Augusto, pela ajuda, paciência e companheirismo.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Sabrina, Cristiane e Cristhian que mesmo longe continuaram fazendo parte desta caminhada comigo, vocês foram e sempre serão o melhor time.

Agradeço imensamente as minhas orientadoras Fernanda e Livia, que me auxiliaram a todo momento, sempre sanando minhas dúvidas com muita paciência e educação, vocês são os exemplos de profissionais que quero seguir. Ao apoio da Tamires, da Thaysa e dos alunos de iniciação científica, Luís e Ana, obrigada por se esforçarem para a concretização deste trabalho e por tudo que me ensinaram.

Estendo meus agradecimentos aos membros da banca examinadora, pela atenção e contribuição no trabalho e, todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR, cada um de vocês foi fundamental para minha formação profissional e pessoal.

Também agradeço ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB, Portugal), nomeadamente à Professora Isabel C. F. R. Ferreira, pelas parcerias com as análises de citotoxicidade e de atividade anti-inflamatória, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado.

A todos, muito obrigada!

OLIVEIRA, A.D. **Avaliação da bioatividade de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.** 45 f. 2019. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2019.

## RESUMO

A Diabetes *Mellitus* é uma doença metabólica crônica, que pode acarretar em elevados níveis de glicose no sangue, uma das alternativas para minimizar os efeitos negativos relacionados a hiperglicemia é a inibição das enzimas hidrolisantes de carboidratos. Além disso, outra doença que tem causado grande preocupação é o Alzheimer, em que uma das hipóteses de sua causa é a que envolve o funcionamento do sistema colinérgico. A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma conífera, pertencente à família Araucariaceae, cultivada principalmente no sul do Brasil, alguns estudos comprovam a presença de compostos fenólicos nas cascas e sementes do pinhão, os quais podem atuar como agentes antioxidantes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os extratos dos resíduos (AC – água do cozimento e CP – extrato da casca) gerados a partir do consumo do pinhão e avaliar suas bioatividade. Foram avaliados os efeitos da presença dos extratos na atividade das enzimas  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína por meio de testes *in vitro* e *in vivo* e também da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Os resultados de IC50 obtidos para alfa amilase salivar foram de 740 e 129  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para pancreática suína de 1871,66 e 460,70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para os extratos AC e CP respectivamente, enquanto que para a acetilcolinesterase foram de 7,31  $\text{mg.mL}^{-1}$  na presença de AC e 8,09  $\text{mg.mL}^{-1}$  para CP e nos ensaios com a butirilcolinesterase foram de 1,94  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 6,96  $\text{mg.mL}^{-1}$  para AC e CP, ainda CP apresentou atividade citotóxica a células tumorais. Esses dados demonstraram que ambos os extratos podem ser considerados como possível alternativa ao tratamento convencional de doenças como a diabetes e o Alzheimer.

**Palavras-chave:** Pinhão. Alfa-amilase. Colinesterases. Antioxidantes.

OLIVEIRA, A.D. **Bioactivity Evaluation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extracts**. 45 f. 2019. Master thesis (Post-Graduation Program of Food Technology – PPGTA). Federal University of Technology – Paraná. Campo Mourão, 2019.

### ABSTRACT

Diabetes *Mellitus* is a chronic metabolic disease, which can lead to high blood glucose levels, one of the alternatives to minimize effects related to hyperglycemia is the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes. In addition, another disease that has caused great concern is Alzheimer's, in which one of its hypotheses is that it involves the functioning of cholinergic system. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is a conifer belonging to the *Araucariaceae* family, grown mainly in southern Brazil, some studies have shown the phenolic compounds in the pine shells and seeds, which may act as antioxidants agents. Therefore, the objective of this work was to characterize the residues extracts (CW and PS) from *pinhão* consumption and to evaluate its bioactivity. The effects of the extracts presence on the activity of human salivary and porcine pancreatic amylases by *in vitro* and *in vivo* tests and also acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. CI50 results used for alpha amylase were 740 and 129  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and for porcine pancreatic 1871.66 and 460.70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for extracts CW and PS respectively, while for acetylcholinesterase were 7.31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for WC and 8.09  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for PS and butyrylcholinesterase assays were 1.94  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 6.96  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for WC and PS, also PS presented cytotoxic activity to tumor cells. These data showed that both extracts acted as enzyme inhibitors and could contribute to the treatment of diseases such as diabetes and Alzheimer's.

**Key-words:** *Pinhão*. Alpha-Amylase. Cholinesterases. Antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Hidrólise da acetilcolina pela ação das colinesterases.....	19
<b>Figura 2</b> - Termogramas de DSC para os extratos provenientes da água do cozimento do pinhão (AC) e da casca do pinhão (CP).....	28
<b>Figura 3</b> - Espectros de FTIR para os extratos AC e CP.....	29
<b>Figura 4</b> - Percentual de inibição das $\alpha$ -amilases em testes <i>in vitro</i> (n = 3) pela presença dos extratos AC e CP: (A) $\alpha$ -amilase salivar humana e (B) $\alpha$ -amilase pancreática suína. ....	31
<b>Figura 5</b> – (A) Análise <i>in vivo</i> da inibição da $\alpha$ -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 <i>in vivo</i> . ....	33
<b>Figura 6</b> - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE): (A) e (C) pela presença do extrato AC e (B) e (D) pela presença do extrato CP. ....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Análise da capacidade antioxidante dos extratos pelo método de DPPH. .....	30
<b>Tabela 2</b> - Média $\pm$ desvio padrão dos valores de concentração de extratos para a inibição de 50% da atividade das alfa-amilases (IC50, $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). .....	32
<b>Tabela 3</b> - Média $\pm$ desvio padrão dos valores de concentração de extratos para a inibição de 50% da atividade das colinesterases (IC50, $\text{mg.mL}^{-1}$ ). .....	35
<b>Tabela 4</b> - Média $\pm$ desvio padrão da citotoxicidade (IG50) e atividade anti-inflamatória (IC50). .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AC	- Extrato proveniente da água residual do cozimento do pinhão
ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
BChE	- Butirilcolinesterase
CP	- Extrato obtido da casca do pinhão
DA	- Doença de Alzheimer
DM	- Diabetes <i>Mellitus</i>
DNS	- 3,5 dinitrosalicílico
DPPH	- 2,2-difenil-picrilhidrazil
DSC	- Calorimetria Diferencial de Varredura
DTNB	- 5',5-ditiobis-2- nitrobenzoato
ERNs	- Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
FTIR	- Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
IC50	- Inibição de 50% de atividade
IG50	- Inibição de 50% do crescimento celular
O <sub>2</sub>	- Oxigênio
ORAC	- <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
pH	- Potencial Hidrogeniônico
TFK	- Tampão Fosfato de Potássio
Tg	- Temperatura de Transição Vítrea
UV-Vis	- Espectroscopia Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS .....	15
3.2 AÇÃO ANTIOXIDANTE .....	15
3.3 ENZIMAS HIDROLISANTES: $\alpha$ -AMILASES .....	17
3.4 COLINESTERASES: ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE .....	18
3.5 <i>Araucaria angustifolia</i> (BERTOL.) KUNTZE .....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 MATERIAL.....	22
4.2 MÉTODOS.....	22
4.2.1 Obtenção dos extratos de pinhão.....	22
4.2.2 Caracterização dos Extratos .....	23
4.2.3 Análise da Capacidade Antioxidante .....	23
4.2.4 Atividade Enzimática .....	24
4.2.5 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares e atividade anti- inflamatória.....	26
4.2.6 Análises Estatísticas .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	28
5.1.1 Análise Térmica.....	28
5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ..	29
5.2 ANÁLISE ANTIOXIDANTE .....	30

5.3 AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA.....	31
5.3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína .....	31
5.3.2 Avaliação <i>in vivo</i> da inibição da $\alpha$ -amilase .....	33
5.3.3 Análise <i>in vitro</i> da inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase ....	35
5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	36
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de algumas doenças, como as neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer e diabetes tem sido associado à acumulação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) no organismo. Assim, a compreensão sobre os mecanismos e a importância do uso de agentes antioxidantes tem se tornado foco de investigação dos pesquisadores, uma vez que essas substâncias são capazes de reduzir o estresse oxidativo, minimizando ou interrompendo as reações em cadeia de radicais livres (AGUIAR; ESTEVINHO; SANTOS, 2016).

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica causada por deficiências, inerentes ou adquiridas, na secreção de insulina ou pela diminuição da sensibilidade dos órgãos em responder a esse hormônio, gerando elevados níveis de glicose no sangue. O aumento no número de diabéticos, juntamente com os efeitos adversos de algumas drogas sintéticas têm contribuído para crescente procura de compostos alternativos, que sejam relativamente mais baratos e apresentem menos efeitos colaterais (DONG et al., 2012).

Os tratamentos convencionais incluem a redução da demanda por insulina, a estimulação da secreção endógena de insulina, o aprimoramento da sua ação nos tecidos alvos e a inibição da degradação de oligo e dissacarídeos (FUNKE; MELZIG, 2006). Isto pode ser conseguido pela inibição de enzimas hidrolisantes de carboidratos, tais como a  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) e a  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20), presentes no trato gastrointestinal, levando a um controle da hiperglicemia pós-prandial (NAMJOYAN; DASTJERDI; EBRAHIM AZEMI, 2015).

Além disso, outra doença que tem intrigado os especialistas é o Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa, em que dentre os sintomas mais comuns estão perda de memória, disfunções cognitivas, distúrbios comportamentais e dificuldade para a realização de atividades diárias e intelectuais. Estima-se que mais de 35 milhões de pessoas no mundo sofram com essa doença e que, até 2050, esse número possa aumentar para mais de 115 milhões de indivíduos (JUNG et al., 2016).

Uma das hipóteses sobre a causa do Alzheimer é a que envolve o sistema colinérgico, sendo caracterizado pelo baixo nível de acetilcolina durante a transmissão colinérgica. Sabe-se que as enzimas acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8) desempenham papel fundamental no encerramento

da transmissão do impulso nervoso, pois são responsáveis pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina (LI et al., 2017; MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2015). Sendo assim, a inibição das enzimas colinesterases pode ser uma alternativa para o tratamento dessa doença (LIU et al., 2017), e o uso de compostos bioativos com a finalidade de modular essas enzimas tem se mostrado promissor para a minimização de danos cognitivos (ROCHA et al., 2018).

Dentre esses compostos destaca-se a semente de araucária (pinhão), que de acordo com Ribeiro, Santos e Bittencourt (2015) representa uma porção expressiva na economia do estado do Paraná, Brasil, sendo de grande interesse para a obtenção de substâncias bioativas, apesar da reconhecida informalidade na produção, já podem ser encontrados produtos industrializados à base de pinhão, como conservas e cervejas (DE FREITAS et al., 2018).

Daudt et al. (2015) realizaram um estudo de caracterização do extrato aquoso das cascas do pinhão e observaram que este apresentou uma quantidade significativa de compostos fenólicos, sendo seu uso considerado relevante como agente antioxidante. Em outro estudo, Da Silva et al. (2014) aplicaram extratos obtidos a partir da casca de pinhão (70% de etanol em água) como inibidor de  $\alpha$ -amilase. Os autores observaram que a composição de taninos do extrato era rica em procianidinas (catequina, epicatequina e ésteres de ácido gálico), sendo o extrato considerado um inibidor eficaz da  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática de suínos. Eles constataram que o extrato da casca de pinhão também foi eficaz na diminuição dos níveis de glicose no sangue de ratos Wistar após a administração de amido.

Assim, a proposta deste trabalho é obter extratos provenientes do processamento do pinhão (AC- água residual do cozimento e CP-extrato da casca residual do pinhão), caracterizá-los e avaliar a viabilidade dos mesmos em relação à capacidade antioxidante, ao efeito inibitório sobre as enzimas  $\alpha$ -amilase (salivar humana e pancreática suína), colinesterases (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais e atividade anti-inflamatória, o que poderia colaborar para o tratamento de doenças como a diabetes e o Alzheimer.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é a avaliação da bioatividade de extratos de resíduos de pinhão.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos provenientes dos resíduos gerados pela preparação do pinhão para o consumo (água do cozimento e cascas);
- Caracterizar os extratos obtidos quanto as suas propriedades térmicas (Calorimetria Diferencial de Varredura, DSC) e estruturas químicas (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, FTIR);
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos pelo método de DPPH;
- Determinar o percentual de inibição na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase (salivar humana e pancreática suína) pelos extratos em testes *in vitro* e *in vivo*;
- Analisar o efeito dos extratos na atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase por meio de testes *in vitro*, utilizando material biológico obtido de *Drosophila melanogaster*;
- Realizar ensaios citotóxicos em linhagens celulares e ensaio de atividade anti-inflamatória na presença dos extratos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos são metabólitos sintetizados por plantas, que podem ser extraídos e empregados em nutracêuticos, alimentos processados e também na indústria farmacêutica (PURI; SHARMA; BARROW, 2012). Englobam componentes essenciais e não essenciais, que estão presentes na natureza, inseridos na cadeia alimentar e que podem apresentar efeitos na saúde humana (BIESALSKI et al., 2009).

As substâncias bioativas presentes nos alimentos apresentam diversas estruturas químicas (SEPTEMBRE-MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2018), podendo ser classificadas em três grandes grupos: terpenos e terpenóides, alcaloides e fenólicos (AZMIR et al., 2013). Na maioria dos casos, os compostos são obtidos de diversas fontes e por diferentes meios de extração, em que fatores como mecanismo, tempo, temperatura e tipo de solvente são de fundamental importância para a eficiência da extração (BONILLA et al., 2015).

Diversas são as evidências de que esses compostos apresentam potencialidade para serem utilizados pelos seres humanos a fim de promover saúde e reduzir os riscos de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimer (PURI; SHARMA; BARROW, 2012). Por essa razão, existem muitos estudos que se concentram em suas atividades biológicas, tais como antidiabéticos, anticancerígenos, anticoagulantes, anti-hipertensivos, antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, entre outras (ZHAO et al., 2018).

#### 3.2 AÇÃO ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são utilizados como aditivos em alimentos com o intuito de minimizar os efeitos da oxidação lipídica. Além do mais, há relatos que essas substâncias são de grande interesse em aplicações clínicas e biológicas, por atuarem na proteção do corpo humano contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Embora as EROs desempenhem papel fundamental em vias celulares e na regulação de concentrações fisiológicas, a geração excessiva destas espécies podem resultar em danos oxidativos que podem estar associados à incidência de diversas doenças, como as neurodegenerativas, câncer e diabetes (MANOHARAN et al., 2016).

O organismo humano possui mecanismos próprios para combater os efeitos dessas espécies, como a produção de antioxidantes endógenos ou exógenos, visando a eliminação dos efeitos tóxicos gerados pelos radicais livres, proteção das células e, conseqüentemente prevenção de doenças (ULLAH, 2016). Estes agentes atuam no corpo humano por diferentes mecanismos de defesa, dentre eles se destacam a diminuição da concentração de oxigênio, minimização da atividade de enzimas pró-oxidantes, aumento da eficiência no transporte de elétrons nas mitocôndrias, prevenção da reação de iniciação e propagação de radicais livres, entre outros (SURAI, 2015).

Já a produção de compostos tóxicos ao organismo é facilitada pelo estresse oxidativo, que pode resultar na geração e agregação desenfreada de proteínas A $\beta$  (hipótese amiloide), estimulação de múltiplos eventos neurotóxicos e produção de EROs, formando um ciclo para a iniciação e a complicação de doenças neurodegenerativas (HANAFY et al., 2017; UDDIN; MAMUN; AKTER, 2016).

A maior parte da geração primária de espécies reativas de oxigênio ocorre nas mitocôndrias (ATASHI; MODARRESSI; PEPPER, 2015). Durante o transporte de elétrons nas mitocôndrias, os elétrons são transferidos para moléculas de oxigênio (O<sub>2</sub>), produzindo moléculas de água. No entanto, quando apenas um elétron é recebido, o oxigênio é reduzido a superóxido, que por sua vez, pode ser convertido a peróxido de hidrogênio. Este peróxido pode ser catalisado, formando um radical hidroxila altamente reativo (TONG et al., 2015).

Acredita-se que disfunções mitocondriais aliadas a baixas concentrações de antioxidantes podem estar relacionadas com o aparecimento de diversas doenças (MANOHARAN et al., 2016). Como por exemplo, o fato de que a avaliação de pacientes diagnosticados com a doença de Alzheimer tem relevado a presença de um alto nível de lipídios em seu lobo temporal e, conseqüentemente, uma maior taxa de peroxidação lipídica, que pode ser justificada pela baixa concentração de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes no organismo (MANOHARAN et al., 2016).

Além disso, o estresse oxidativo também pode estar relacionado com o desenvolvimento da diabetes, uma vez que durante o metabolismo oxidativo nas mitocôndrias pode ocorrer a formação de radicais livres de oxigênio, o que implica diretamente na modulação da insulina, em que por um lado, as espécies são produzidas em resposta à sinalização do hormônio e exercem sua função fisiológica

normalmente e de outro, apresentam regulação negativa, fazendo com que aumente a resistência à insulina, tornando um fator de risco para a diabetes tipo 2 (ULLAH, 2016).

### 3.3 ENZIMAS HIDROLISANTES: $\alpha$ -AMILASES

A diabetes *Mellitus* é uma doença metabólica crônica, causada por alterações ou deficiências na produção de insulina (STOJKOVIC et al., 2019). Cerca de 90% dos pacientes diagnosticados apresentam diabetes do tipo 2 e estima-se que até 2030 o número de pacientes que sofrerão com a doença será de 180 milhões de pessoas em todo o mundo (SEMAAN et al., 2017; SENTHIL et al., 2019).

A diabetes tipo 1 ocorre predominantemente em crianças e jovens, e é caracterizada pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina, o que conseqüentemente causa a falta deste hormônio, exigindo sua reposição exógena (RAWSHANI et al., 2017).

Já a diabetes tipo 2 pode ocorrer pela insuficiência ou deficiência na secreção da insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas ou então, pela falta ou diminuição da sensibilidade dos receptores de insulina, gerando elevados níveis de glicose no sangue (DURAI SWAMY et al., 2016). A ingestão excessiva de carboidratos, a obesidade e o estilo de vida tornam-se agravantes para o desenvolvimento desse tipo da doença (JUSTINO et al., 2018).

Uma das principais fontes de carboidratos para o ser humano é o amido, sendo composto de amilose, um polímero predominantemente linear, em que as unidades de glicose são unidas por meio de ligações  $\alpha$  (1,4) e pela amilopectina, que é altamente ramificada, devido à presença das ligações  $\alpha$  (1,6) (DHITAL; GIDLEY; WARREN, 2015; SVIHUS; HERVIK, 2016).

O amido da dieta é digerido pela  $\alpha$ -amilase, que o degrada em maltose. Em seguida, pela ação  $\alpha$ -glicosidase, ocorre a formação de unidades de glicose. A rápida degradação do amido resulta em altos níveis de glicose no sangue, também conhecidos como hiperglicemia pós-prandial (SENTHIL et al., 2019). Assim, o controle dos níveis de glicose ainda continua sendo o principal mecanismo no tratamento de pacientes diagnosticados com diabetes tipo 2, que pode ser alcançado pela inibição das enzimas hidrolisantes (MAZZUCHELLI et al., 2015).

A inibição pode ser conseguida pelo uso de substâncias comerciais como a acarbose, voglibose e miglitol, que podem ser utilizadas isoladas ou em combinação com secretagogos de insulina. Contudo, estes compostos são relatados como causadores de vários efeitos colaterais, tais como distúrbios hepáticos, flatulências e cólicas abdominais. Além disso, alguns deles podem aumentar a incidência de tumores renais, lesão hepática e hepatite aguda (SHOBANA; SREERAMA; MALLESHI, 2009).

Assim, diversos estudos têm investigado fontes alternativas para estas substâncias, principalmente provenientes de compostos naturais derivados de produtos vegetais e agrícolas, como os compostos fenólicos que apresentam atividade inibitória de moderada a alta contra a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glicosidase, sem os efeitos colaterais negativos associados aos inibidores sintéticos (NYAMBE-SILAVWE et al., 2015).

O efeito inibitório pode estar relacionado com a estrutura molecular dos fenóis, sendo resultado das interações dos polifenóis com a enzima, tais como ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila e o sítio ativo da enzima e interações hidrofóbicas entre anéis aromáticos dos polifenóis com a enzima (SUN; GIDLEY; WARREN, 2017).

Os compostos avaliados por tais estudos têm sido extraídos de cevada (RAMAKRISHNA et al., 2017), folhas de graviola (JUSTINO et al., 2018), camomila, alecrim, jambolão, melão de são caetano, entre outros (FRANCO et al., 2018). Além disso, estes compostos bioativos também possuem fortes potenciais de eliminação de radicais livres, consequência de sua alta capacidade antioxidante e potencialmente podem ajudar a mitigar os efeitos do estresse oxidativo crônico induzido pela hiperglicemia (WICKRAMARATNE; PUNCHIHEWA; WICKRAMARATNE, 2016).

Outra doença que também tem chamado a atenção das organizações de saúde é o Alzheimer, que tem sido descrito como diabetes tipo 3 e sua incidência pode estar associada a diabetes tipo 2. Alguns estudos defendem que as proteínas relacionadas com a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase desempenham papel primordial na resistência da insulina e no metabolismo lipídico (WIWANITKIT, 2008).

### 3.4 COLINESTERASES: ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE

Ainda não há um consenso sobre a causa do Alzheimer, algumas hipóteses são que o desenvolvimento da doença estaria ligado com a perda de sinapses,

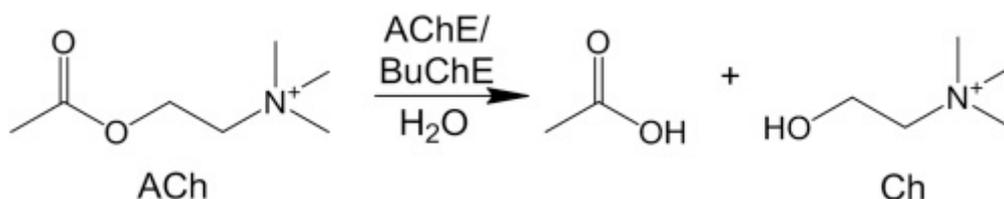
estresse oxidativo, anormalidades funcionais e estruturais das mitocôndrias, modificações hormonais, alterações na neurotransmissão colinérgica, entre outras (KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2017).

Todavia, a hipótese colinérgica defende que a redução da neurotransmissão no córtex cerebral e a destruição de neurônios colinérgicos podem comprometer as funções cognitivas. Além do mais, a redução dos níveis de acetilcolina foi observada em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer e ensaios *in vivo* confirmam a importância desse neurotransmissor para processos de aprendizagem e memória (BONESI et al., 2018).

A acetilcolina após ser liberada de vesículas da região terminal dos neurônios, pode estimular os receptores nicotínico ou muscarínico de acetilcolina, que atuam ativamente no sistema nervoso central, periférico e na junção de tecidos nervosos (TAYLOR; POHANKA, 2013).

As enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase são as responsáveis por hidrolisar a acetilcolina em acetato e colina (GÜLÇİN et al., 2016), conforme representado na Figura 1.

**Figura 1** - Hidrólise da acetilcolina pela ação das colinesterases.



Fonte: Souza; Rennó; Figueroa-Villar (2016).

Estas enzimas se diferenciam pela sua estrutura, função e localização nos tecidos, atividade e sensibilidade à substâncias químicas, são extremamente evolutivas e estão presentes em tecidos de diferentes organismos, como em animais vertebrados, invertebrados, aquáticos e terrestres (PEREIRA; SILVA-ZACARIN; JONES, 2019).

A acetilcolinesterase desempenha um papel fundamental em inativar a acetilcolina em segundos ou milésimos de segundos, após a sua liberação de um neurônio colinérgico pré-sináptico (POPE; BRIMIJOIN, 2018). A butirilcolinesterase também participa da neurotransmissão colinérgica, atuando como co-reguladora da hidrólise da ACh, mesmo estando predominantemente localizada nos tecidos

periféricos e no plasma e em uma menor quantidade em regiões do cérebro (ANAND; SINGH, 2013).

Dessa forma, percebe-se que a alta atividade das colinesterases pode diminuir os níveis de acetilcolina, neurotransmissor fundamental para a transmissão colinérgica, levando à perda das funções intelectuais, como problemas de comunicação e desorientação de tempo e espaço (PANEK et al., 2017; SINGH et al., 2013).

Existem alguns fármacos como donepezil, rivastigmina e galantamina comumente usados no tratamento de Alzheimer (DARYADEL et al., 2018). Entretanto, esses fármacos apresentam uma eficácia e uma eficiência limitada para controlar os sintomas da doença (ANAND; SINGH, 2013). Os metabólitos secundários provenientes de fontes naturais têm atuado como inibidores de acetilcolinesterase, como esteróis, terpenóides, flavonóides e compostos fenólicos (AJAYI et al., 2019).

Comumente, o método colorimétrico desenvolvido por Ellman et al. (1961) é utilizado para a avaliação da atividade das colinesterases. A técnica consiste na medição da hidrólise da acetiltiocolina em tiocolina, pela reação do grupo tiol com 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico), que acarreta na formação de uma coloração amarela, que pode ser medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 412 nm.

Nos insetos, o sistema colinérgico é responsável pela movimentação das asas, locomoção, aprendizagem e memória. Um exemplo de modelo muito utilizado para estudar os processos neurológicos são as moscas de fruta (*Drosophila melanogaster*), especialmente pelo fato de serem manipuladas geneticamente com maior facilidade (PYAKUREL; SHIN; VENTON, 2018; SHIN; VENTON, 2018).

### 3.5 *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma conífera, pertencente à família Araucariaceae, sendo cultivada principalmente no sul do Brasil, Chile, Argentina e Paraguai (SILVA et al., 2016). No Brasil, as árvores são conhecidas popularmente como “pinheiros do Paraná” ou “pinheiros brasileiros” e representam grande importância para o reflorestamento e a conservação da Mata Atlântica (BRANCO et al., 2014; FURLANETTO et al., 2019). Além disso, são responsáveis por uma parcela expressiva da economia brasileira e seus subprodutos são frequentemente utilizados

pela medicina, principalmente no tratamento de doenças respiratórias (ARALDI et al., 2016; BRANCO et al., 2015).

O estróbilo feminino da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze são as sementes comestíveis, denominadas de pinhão, apresentam cerca de 36% de amido, 3% de proteína, 1% de lipídio, 2% de açúcares solúveis, e menos de 0,2% de fibras, minerais e compostos fenólicos (BICUDO et al., 2009; BRANCO et al., 2015). O pinhão é produzido entre os meses de abril e agosto, normalmente é consumido após o seu cozimento. Durante o processo de cocção, compostos coloridos presentes nas cascas podem migrar tanto para água quanto para a própria semente (KOEHNLEIN et al., 2012; PEDROSO et al., 2018; PERALTA et al., 2016).

Estima-se que aproximadamente 10 toneladas por ano de cascas de pinhão são descartadas direto no meio ambiente e esses resíduos podem levar muito tempo para se decompor (PERALTA et al., 2016), ressaltando a importância de se buscar alternativas para o aproveitamento desses resíduos e de seu uso sustentável (PEDROSO et al., 2018). Além disso, alguns estudos comprovam a presença de compostos fenólicos nas cascas e sementes da araucária, os quais podem atuar como agentes antioxidantes (MICHELON et al., 2012).

Dessa forma, muitos pesquisadores têm buscado alternativas para a utilização desses compostos, tais como aplicações em embalagens ativas (DAUDT et al., 2017; DE FREITAS et al., 2018), cosméticos (MOTA et al., 2014), inibidores de  $\alpha$ -amilase (DA SILVA et al., 2014), lipase pancreática (OLIVEIRA et al., 2015) e de células cancerígenas (SOUZA et al., 2014).

Diante do exposto, a proposta desse trabalho é obter extratos provenientes da água do cozimento do pinhão e de suas cascas, analisar suas características, capacidade antioxidante e seu efeito sob a ação das enzimas  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, e da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase através de testes *in vitro* utilizando material biológico de *Drosophila melanogaster*, atividade anti-inflamatória, bem como a citotoxicidade frente a células tumorais e normais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

O pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) foi adquirido no mercado local da cidade de Campo Mourão - PR, em abril de 2018. Na extração dos compostos antioxidantes da casca foi utilizado álcool etílico (Dinâmica, Brasil). Para a análise da capacidade de antioxidante foi utilizado o radical DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil, Sigma-Aldrich) e metanol (Dinâmica). Na avaliação da inibição das  $\alpha$ -amilases foram utilizadas as enzimas salivar humana (Tipo IXA, 87,5 unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich) e pancreática suína (Tipo VI-B,  $\geq 10$  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). Para a análise das colinesterases (AChE e BChE) foram utilizados trihidroximetil aminometano (Tris-HCl, Dinâmica), tampão fosfato de potássio (Fosfato de potássio monobásico (99,93%, Neon) e dibásico (100,3%, Mallinckrodt), DTNB (98%, Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina e S- butiriltiocolina (Sigma-Aldrich). As linhagens celulares de tumores humanos utilizadas na análise de citotoxicidade foram obtidas no Instituto Leibniz DSMZ – Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Obtenção dos extratos de pinhão

O extrato da água do cozimento (AC) foi obtido conforme descrito por De Freitas et al. (2018). Após a cocção do pinhão (500 g/L de água, 2 horas em ebulição), a água foi filtrada, rotaevaporada (90 °C), congelada em ultrafreezer (Liotop) a -80 °C e, por fim, liofilizada.

Já para a obtenção do segundo extrato a metodologia aplicada foi de acordo com o ensaio número 12 do planejamento experimental (ponto otimizado) apresentado por Santos et al. (2018). Para tanto, as cascas do pinhão (CP) foram secas em estufa (60 °C, 24h), em seguida, foram trituradas em um moinho de facas (SOLAB) e então, 200 mL de álcool etílico foram adicionados em 17,5 g de casca. A solução foi submetida à agitação em ultraturrax (Ika, T25) durante 15 minutos a 12.000

rpm. Por fim, a mistura foi filtrada com auxílio de uma bomba à vácuo e colocada na estufa a 50 °C até completa evaporação do solvente.

## 4.2.2 Caracterização dos Extratos

### 4.2.2.1 Análise térmica

A caracterização térmica dos extratos foi realizada utilizando-se um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer, 4000). Cerca de 10 mg das amostras pré acondicionadas em dessecador contendo sílica foram colocadas em painéis de alumínio, as rampas de aquecimento foram realizadas de 0 a 350 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob fluxo de nitrogênio gasoso (20 mL/min).

### 4.2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a determinação das características moleculares dos extratos foi realizado o ensaio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Para isto, com o auxílio de um pistilo e um almofariz, cerca de 10 mg de amostra foram trituradas juntamente com 0,2 g de brometo de potássio (KBr) para a formação da pastilha, possibilitando a análise. As pastilhas foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). A leitura do espectro foi realizada em um espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu), na faixa de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup> de comprimento de onda, utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As bandas foram normalizadas para comparação dos espectros.

### 4.2.3 Análise da Capacidade Antioxidante

Para a resuspensão dos compostos antioxidantes dos extratos, foram pesados cerca de 0,032 g de cada extrato e adicionado 4 mL de etanol (Dinâmica), em seguida, a solução foi colocada no ultrassom (Fischer Scientific, modelo 120, ponteira de 1/8”) por 5 minutos (30 s ligado e 10 s de pausa) e então, filtrada (filtro-seringa) para ser utilizada na análise antioxidante.

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada utilizando DPPH como radical livre, seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas alterações. Foram adicionados 50 µL de extrato em 1.950 µL de solução metanólica de DPPH 60 µmol.L<sup>-1</sup> em um tubo de ensaio, e 50 µL de etanol

em 1.950  $\mu\text{L}$  de DPPH em um outro tubo (controle negativo), sendo o experimento realizado em triplicata. As soluções ficaram ao abrigo da luz por 30 minutos e então, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm, usando metanol como branco.

Os resultados finais foram obtidos por meio da curva de calibração de trolox ( $y = 0,0905x + 0,8656$ ) e expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente de trolox por 100 gramas de extrato.

#### 4.2.4 Atividade Enzimática

##### 4.2.4.1 Avaliação *in vitro* da inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína

A determinação da inibição da  $\alpha$ -amilase em termos de IC<sub>50</sub> (concentração de extrato necessária para causar inibição de 50% na atividade enzimática) foi realizada conforme metodologia descrita por Da Silva et al. 2014, com algumas modificações. A  $\alpha$ -amilase pancreática (suína) e a  $\alpha$ -amilase salivar humana foram solubilizadas em tampão fosfato (40 mmol/L) e NaCl (13,4 mmol/L), pH 6,9. O amido de batata foi utilizado como substrato (1% em água). Os extratos de pinhão foram avaliados como inibidores nas concentrações finais de 2000, 1400, 800, 200, 80 e 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo a reação iniciada pela adição da enzima.

A concentração de enzima adicionada a cada sistema de reação foi de 74 U/mL para ambas as enzimas. 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) em comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959).

Para análise dos resultados foi utilizado o método de interpolação numérica com a equação de Stineman (WAGON, 1999) para calcular as concentrações dos extratos que foram capazes de inibir a atividade enzimática em 50% (IC<sub>50</sub>). O *software* utilizado foi o programa Scientist da MicroMath Scientific Software (Salt Lake City, UT, USA).

##### 4.2.4.2 Avaliação *in vivo* da inibição da $\alpha$ -amilase

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hepático e Radioisótopos da Universidade Estadual de Maringá. Para a realização dos ensaios, o trabalho foi submetido e aceito pela comissão de ética no uso de animais

(CEUA/UEM) sob número de protocolo 2935011018. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar pesando  $230 \pm 20$  g, que foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá em condições padronizadas de temperatura ( $22 \pm 3$  °C) e ciclo claro/escuro de 12h. Os animais receberam água filtrada e ração comercial (Nuvilab®) *ad libitum* durante todo o período de permanência no Biotério. Os ensaios para avaliação do efeito dos extratos AC e CP sobre a inibição da  $\alpha$ -amilase *in vivo* foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Da Silva et al. (2014). Para este procedimento os ratos foram mantidos em jejum prévio de 12 horas e então divididos em 8 grupos ( $n = 5$  a 7 ratos por grupo), em que todos receberam amido de milho ( $1 \text{ g kg}^{-1}$  de peso corporal) dissolvido em água, seguido dos tratamentos (também dissolvidos em água) via gavagem em dose única. Os tratamentos foram separados de acordo com os seguintes grupos: O Grupo I (controle) foi tratado com o veículo de dissolução dos extratos (água). O Grupo II recebeu acarbose ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Os grupos III, IV e V receberam extrato AC nas concentrações de 100, 250 e  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  e os grupos VI, VII e VIII foram tratados com o extrato CP nas mesmas concentrações descritas para AC. Em seguida, as avaliações dos níveis de glicose no sangue ocorreram aos 15, 30, 45 e 60 minutos após a gavagem. As amostras de sangue da veia da cauda do animal foram analisadas por meio de um glicosímetro (Accu-Check® Active).

#### 4.2.4.3 Análise *in vitro* da atividade das colinesterases: Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE)

As atividades da AChE e BChE foram medidas conforme descrito por Ellman et al. (1961) e modificado por Silva de Sá et al. (2019). Para o preparo do homogeneizado foram sensibilizadas, por meio de banho de gelo, 100 moscas (*Drosophila melanogaster*), solubilizadas em 1 mL de solução de Tris-HCl (0,05 M, pH 7,4), a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos e então, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em ultrafreezer ( $-80$  °C) para posteriores análises da atividade das colinesterases.

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando o meio de reação que continha 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (TFK, 100 mM, pH 7,5), 20  $\mu\text{L}$  de água, 10  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 20  $\mu\text{L}$  de extratos (nas concentrações finais de 20, 14, 8 e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), além do branco (sem adição de extrato). Primeiramente, o meio foi incubado

a 30 °C por 5 minutos e em seguida, foram adicionados, ao abrigo da luz, 20 µL de 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico, DTNB) e 20 µL de acetiltiocolina, enquanto que no teste da BChE, esse volume foi substituído pelo mesmo volume de butiriltiocolina. A leitura foi realizada a cada um minuto (durante 4 minutos), no leitor de placas (Thermo-Plate Reader) em um comprimento de onda de 405 nm.

Os ensaios das concentrações dos dois extratos foram realizados em quatro repetições (n = 4) e em duplicata, sendo realizado a dosagem de proteínas e os resultados foram calculados em  $\mu\text{mol.AcSCh.h}^{-1}.\text{mgprot}^{-1}$  e expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (100 %).

#### 4.2.5 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares e atividade anti-inflamatória

As análises de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória foram realizadas no Centro de Investigação de Montanha (CIMO), localizado no Instituto Politécnico de Bragança (IPB, Portugal). A avaliação da citotoxicidade dos extratos (AC e CP) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Silva de Sá et al. (2019), sendo utilizadas as seguintes linhagens celulares de tumores humanos: adenocarcinoma da mama (MCF - 7), carcinoma pulmonar (NCIH460), cervical (HeLa) e hepatocelular (HepG2). As células de fígado de suínos foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Abreu et al. (2011). Os resultados foram expressos em valores de IG50 (concentração referente a 50% de inibição do crescimento celular).

Na determinação da atividade anti-inflamatória, a produção do lipopolissacarídeo (LPS) induzida por óxido nítrico (ON) em linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) foi quantificada como concentração de nitrito no meio de cultura. Para a medição de ON utilizou-se o *kit* Griess Reagent System. A dexametasona foi usada como controle positivo. Os resultados foram expressos como valores de IC50 (concentração de composto responsável por 50% e inibição na produção de óxido nítrico).

#### 4.2.6 Análises Estatísticas

Os resultados da capacidade antioxidante foram submetidos à análise t-Student ou à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey a um nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ) por meio do programa Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

Já os resultados da atividade das colinesterases foram submetidos ao teste de comparação de médias ANOVA de um único fator e para análise de comparação utilizou-se o pós-teste de Tukey, no *software* GraphPad Prism 5.0 com nível de significância de 5%.

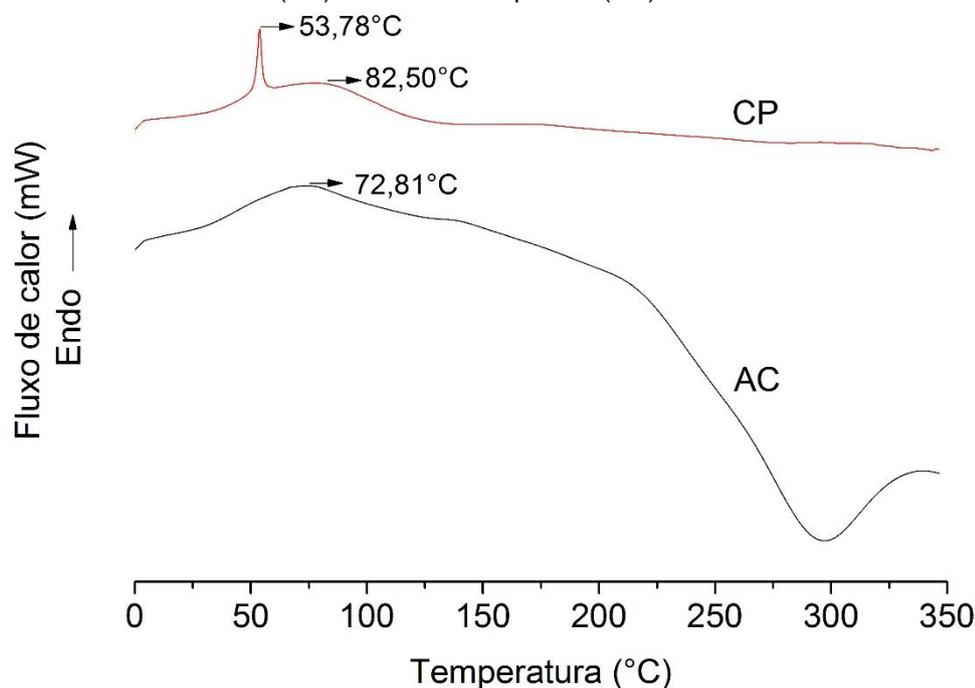
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

#### 5.1.1 Análise Térmica

Na Figura 2 são apresentados os termogramas da análise de Calorimetria Diferencial de Varredura para os dois extratos estudados.

**Figura 2** - Termogramas de DSC para os extratos provenientes da água do cozimento do pinhão (AC) e da casca do pinhão (CP).



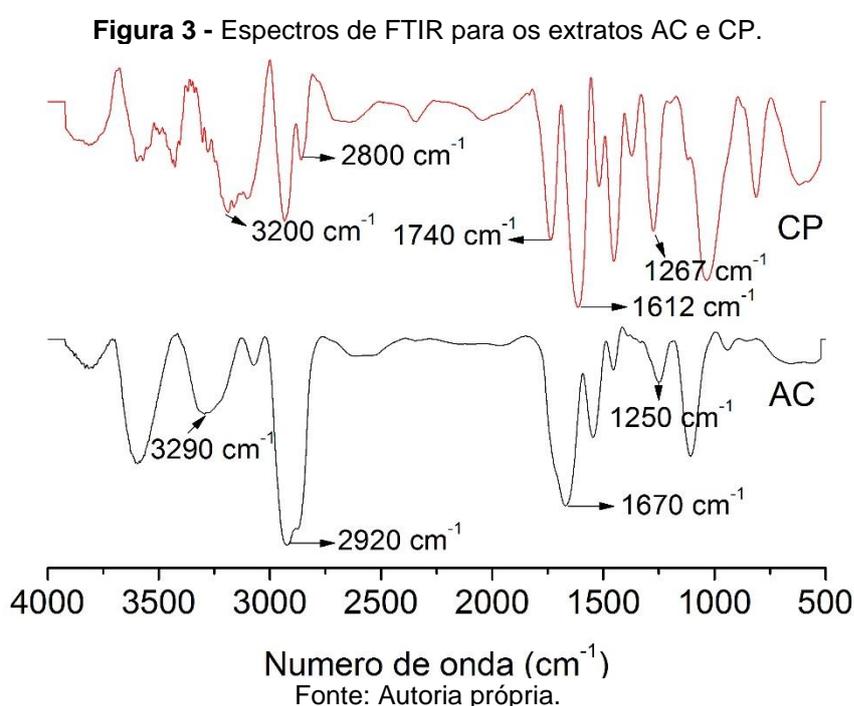
Fonte: Autoria própria.

Verificam-se picos endotérmicos próximos a 80 °C nos dois termogramas, esta transição pode estar relacionada com a evaporação da água presente nas amostras (DO PRADO SILVA et al., 2017). Além disso, na amostra CP um pico bem definido é observado na temperatura de aproximadamente 54 °C, que possivelmente está relacionado 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; DA SILVA RODRIGUES-CORRÊA; FETTNETO, 2015; YAMAMOTO; OTTO; SIMONEIT, 2004). De acordo com Tsanaktsidis et

al. (2013) a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) da resina de *Pinus halepensis* está localizada em 37 °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.

### 5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 3 são apresentados os espectros de infravermelho para ambos os extratos (AC e CP).



Em 1612  $\text{cm}^{-1}$  pode ser observada uma banda de maior intensidade da amostra CP, que está relacionada ao grupamento C = C da catequina (RAMOS-TEJADA et al., 2002). Além disso, a banda referente a ligação C = O localiza-se em 1740  $\text{cm}^{-1}$  e em 1670  $\text{cm}^{-1}$  para as amostras CP e AC, respectivamente. De acordo com o estudo realizado por 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  $\text{cm}^{-1}$  e 1770  $\text{cm}^{-1}$ .

Em 2920 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  estão localizadas as bandas do estiramento  $\text{CH}_2$  (RICCI et al., 2015). Ainda, observa-se a presença da banda característica do estiramento -OH, nas duas amostras de extrato, em 3290  $\text{cm}^{-1}$  para AC e 3200  $\text{cm}^{-1}$  para CP. 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, há frações com alto grau de polimerização, o que resulta em uma banda larga distribuída sobre o espectro na região de 3700 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ . 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. Quanto mais uniformes são essas interações, mais nítida é a banda, e entre as duas amostras a banda mais nítida é observada em AC.

No espectro da amostra CP a banda localizada em 1267  $\text{cm}^{-1}$  refere-se a deformação no plano de C-OH (*bending*) em polifenóis (DA SILVA et al., 2014), sendo muito mais evidente que a da amostra AC, além desta última apresentar posição diferente (1250  $\text{cm}^{-1}$ ). Este resultado deve estar relacionado com a maior quantidade de compostos que apresentam a ligação C-OH no extrato da casca do pinhão devido à polaridade do solvente utilizado na extração.

## 5.2 ANÁLISE ANTIOXIDANTE

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos na análise da capacidade antioxidante pelo método de DPPH.

**Tabela 1** – Análise da capacidade antioxidante dos extratos pelo método de DPPH.

Capacidade antioxidante		
Método	Extrato AC ( $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/100\text{g}_{\text{extrato}}$ )	Extrato CP ( $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/100\text{g}_{\text{extrato}}$ )
DPPH	6987,11 <sup>a</sup> ± 170,02	12937,34 <sup>b</sup> ± 12,45

\*As médias das amostras (n = 3) acompanhadas pela mesma letra, na mesma linha (minúsculo) não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste t-Student.

\*\* $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/100\text{g}_{\text{extrato}}$ : micro mol de equivalente de trolox por 100 gramas de extrato.

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que o extrato proveniente da casca do pinhão apresentou cerca de 2 vezes maior capacidade antioxidante frente ao radical DPPH quando comparado com a água do cozimento, esse resultado demonstra que mesmo após a cocção, a maioria dos compostos que atuam como antioxidante ainda continuam presentes na casca e que apenas uma parte migra para 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  $11,78 \mu\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{g}^{-1}$  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, condições climáticas, entre outros fatores que possam interferir na ação antioxidante (VIEIRA et al., 2019).

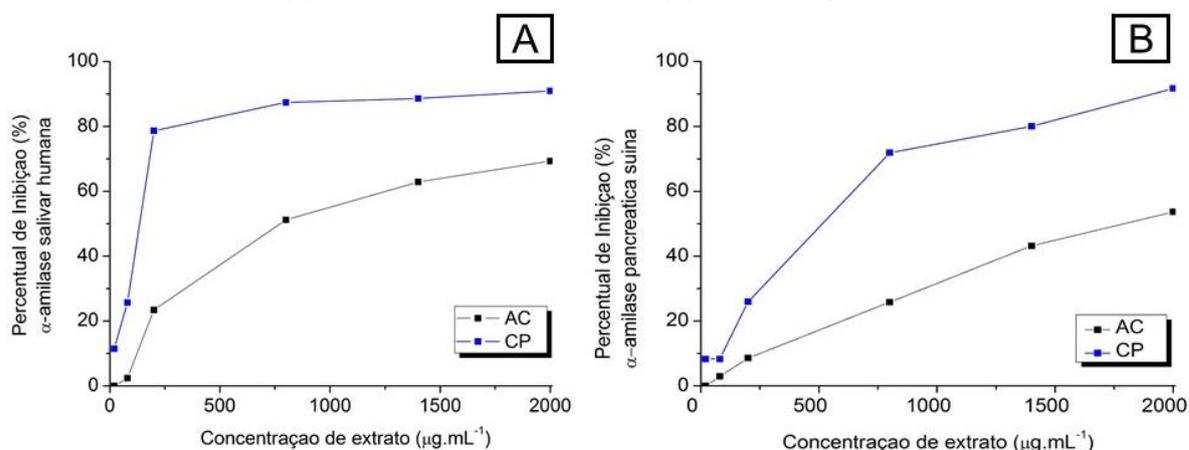
Mota et al. (2014) analisaram a capacidade antioxidante de extratos metanólicos da casca e da semente do pinhão pelos métodos de DPPH, ABTS e ORAC, observaram que o extrato da casca demonstrou capacidade antioxidante superior ao da semente e ainda, identificaram a presença de moléculas que possuem a capacidade de sequestrar os radicais livres, como compostos polifenóis, flavonóides e protoantocianidinas.

### 5.3 AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA

#### 5.3.1 Avaliação *in vitro* da inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína

Na Figura 4 estão demonstrados os percentuais de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína, pela presença dos extratos em diferentes concentrações.

**Figura 4** - Percentual de inibição das  $\alpha$ -amilases em testes *in vitro* (n = 3) pela presença dos extratos AC e CP: (A)  $\alpha$ -amilase salivar humana e (B)  $\alpha$ -amilase pancreática suína.



Fonte: Autoria própria.

Pode-se notar na Figura 4 que o comportamento de inibição para os dois extratos testados é semelhante, tanto para a amilase salivar quanto para a enzima pancreática. Todavia, fica evidente que o extrato CP foi mais eficiente, alcançando

percentuais de inibição próximos a 100% na maior concentração testada (2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Estes resultados permitiram calcular os valores de IC50 para ambos os extratos, que estão apresentados na Tabela 2. Estes valores se referem às concentrações dos extratos responsáveis por inibir 50% da atividade das enzimas.

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

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

Fonte: Autoria própria.

Com os testes *in vitro* percebe-se que para ambas as enzimas o extrato proveniente da casca do pinhão (CP) apresentou maior efeito inibitório quando comparado com a água do cozimento (AC). De fato, pode ser verificado que o extrato CP apresentou valores de IC50 aproximadamente 4 vezes menores que o extrato AC, tanto para a  $\alpha$ -amilase salivar quanto para a pancreática. Este efeito está muito provavelmente relacionado à diferença de concentração dos compostos bioativos presentes nos dois extratos.

É interessante notar ainda, que a  $\alpha$ -amilase salivar é mais sensível à inibição pelos extratos do que a  $\alpha$ -amilase pancreática. O IC50 do extrato CP é 3,5 vezes maior para a enzima pancreática quando comparado com o resultado da enzima salivar, e para o extrato AC, a relação entre os valores de IC50 é de 2,5.

Da Silva et al. (2014) ao analisarem 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  $\alpha$ -amilase salivar e pancreática suína, estando de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho. No trabalho de Silva et al. (2014), o efeito inibitório do extrato da casca de pinhão sobre a  $\alpha$ -amilase foi atribuído aos taninos condensados, principalmente procianidinas.

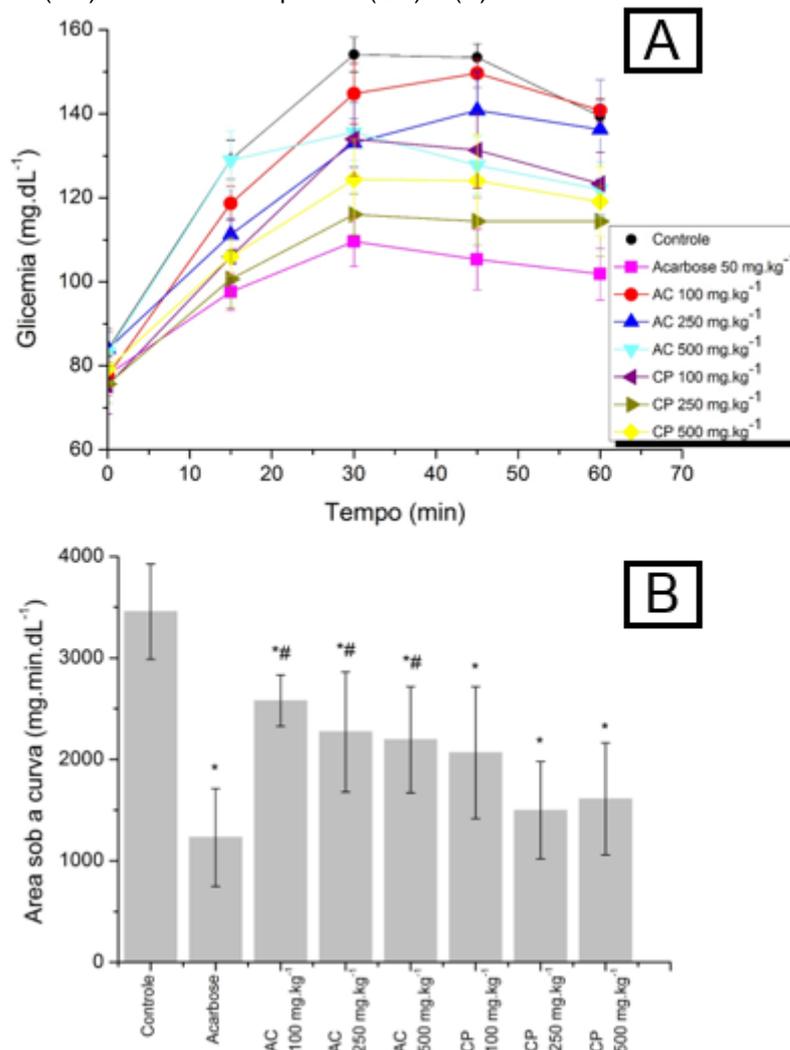
Além disso, outros trabalhos avaliaram a inibição das  $\alpha$ -amilases por extratos naturais, como os das plantas da espécie *Teucrium* (DASTJERDI; NAMJOYAN; AZEMI, 2015), das folhas de *Steudnera colocasiifolia* (SHAH et al., 2016), de *Muscari comosum* (CASACCHIA et al., 2017) e de folhas de *Phrynium imbricatum* (HABIB et

al., 2017). Todos enumeram concentrações superiores de IC50 quando comparado com os extratos residuais do pinhão, evidenciando uma maior efetividade desses últimos.

### 5.3.2 Avaliação *in vivo* da inibição da $\alpha$ -amilase

Na Figura 5 estão demonstrados os resultados do índice glicêmico de ratos Wistar após ingestão de amido (controle) e dos que receberam os extratos (AC e CP) por via oral. Nestes experimentos, a acarbose, um pseudotetrassacarídeo inibidor de  $\alpha$ -glicosidases utilizado como hipoglicemiante no tratamento da diabetes *Mellitus* tipo 2, foi utilizada como controle positivo.

**Figura 5** – (A) Análise *in vivo* da inibição da  $\alpha$ -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*.



\*Diferença significativa do controle ( $p < 0,05$ ).

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

Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que o grupo controle, que recebeu apenas amido, apresentou altos níveis de glicose no sangue. O pico médio da glicemia nestes animais ( $154 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) ocorreu aos 30 minutos após a ingestão do amido, apresentando tendência à diminuição a partir dos 45 minutos. A acarbose diminuiu eficientemente a glicemia dos animais sendo que, aos 30 minutos após ingestão do amido (Figura 5 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 sob a curva, Figura 5 B), é possível notar que houve uma diminuição de 64% pela acarbose em comparação com o grupo controle.

O extrato AC foi capaz de diminuir significativamente a glicemia dos animais, sendo, todavia, menos eficiente que a acarbose nas concentrações que foram testadas. Aos 30 minutos após a ingestão de amido (Figura 5 A), a glicemia dos animais tratados com o extrato AC foi 13%, 18% e 17% menor do que o controle ( $p < 0,05$ ) para as concentrações de 100, 250 e 500  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente. Ao se analisar o total de glicose absorvida em 1 hora (Figura 5 B), a administração do extrato AC resultou em uma diminuição de 25%, 34% e 36% na glicemia dos animais em relação ao grupo controle, para as concentrações de 100, 250 e 500  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente.

Já o extrato CP não diferiu significativamente da acarbose, demonstrando uma diminuição de 40%, 56% e 53% no total de glicose absorvida pelos animais que ingeriram as concentrações de 100, 250 e 500  $\text{mg.kg}^{-1}$  respectivamente, em relação ao grupo controle. Esses resultados confirmam os dados obtidos na análise *in vitro* em que o extrato proveniente da casca do pinhão apresentou maior efeito inibitório nas  $\alpha$ -amilases quando comparado com o da água do cozimento.

Os resultados obtidos nos testes de inibição da  $\alpha$ -amilase *in vivo* e *in vitro* demonstram que os extratos poderiam ser utilizados na minimização dos efeitos da hiperglicemia pós-prandial, especialmente em pacientes diabéticos.

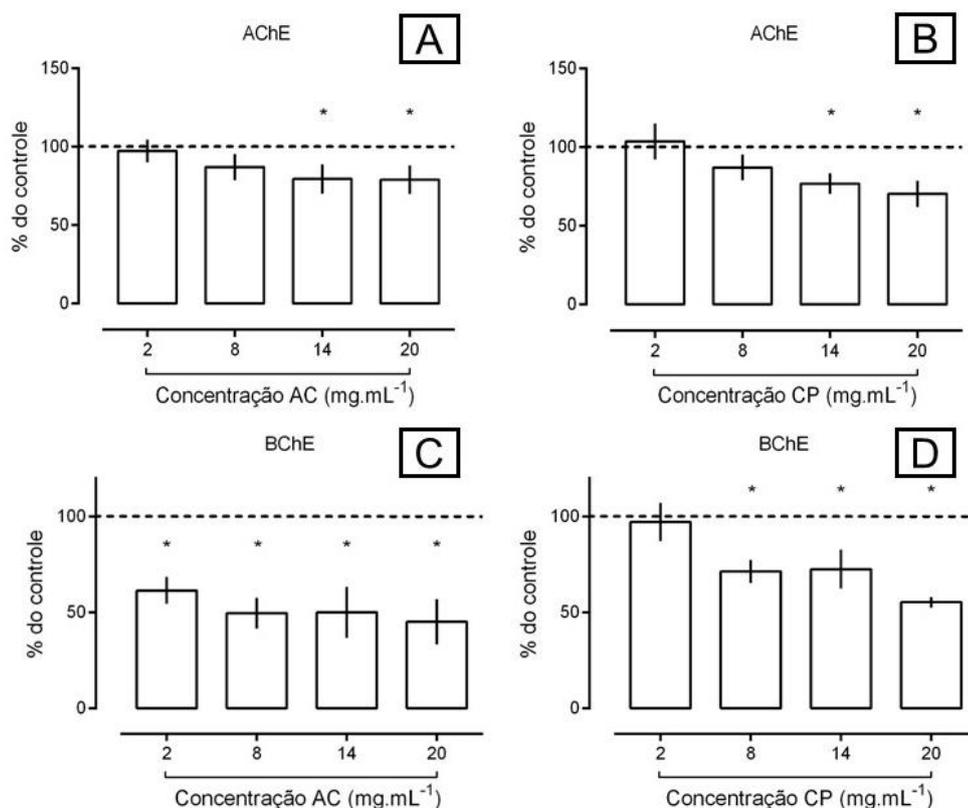
Oliveira et al. (2015) avaliaram, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, o efeito da casca do pinhão sob a lipase pancreática e perceberam que o extrato também possui atividade inibitória para essa enzima, sendo capaz de reduzir os níveis de triglicerídeos no plasma sanguíneo de camundongos. Esta é uma propriedade interessante e que complementa a atividade inibidora da  $\alpha$ -amilase, já que a inibição destas duas enzimas em conjunto pode contribuir para a redução ou controle do peso

corporal, um aspecto que também é importante para os pacientes portadores de diabetes tipo 2.

### 5.3.3 Análise *in vitro* da inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase

Na Figura 6 são apresentados os resultados referentes a atividade das colinesterases com a presença dos extratos (AC e CP).

**Figura 6** - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE): (A) e (C) pela presença do extrato AC e (B) e (D) pela presença do extrato CP.



Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \* p < 0,05.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 3 estão dispostos os valores das concentrações responsáveis por reduzir 50% da atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

**Tabela 3** - Média  $\pm$  desvio padrão dos valores de concentração de extratos para a inibição de 50% da atividade das colinesterases (IC<sub>50</sub>, mg.mL<sup>-1</sup>).

	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> ) Água do cozimento do pinhão (AC)	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> ) Extrato da casca do pinhão (CP)
Acetilcolinesterase	7,31 $\pm$ 0,10	8,09 $\pm$ 0,06
Butirilcolinesterase	1,94 $\pm$ 0,02	6,96 $\pm$ 0,07

Fonte: Autoria própria.

Conforme demonstrado na Figura 6 (A e B), a atividade da enzima acetilcolinesterase foi inibida significativamente em relação ao controle com as maiores concentrações de extrato (14 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>) tanto para o extrato AC quanto para CP.

Carrazoni et al. (2017) utilizaram extrato de acículas de *Araucaria angustifolia* em material biológico de baratas e verificaram diferenças significativas na ação da acetilcolinesterase pelo efeito do extrato em concentrações de 200 e 400 µg.g<sup>-1</sup> de animal, sendo que esse extrato também atuou como inibidor da enzima.

Ao avaliar os resultados da atividade das colinesterases, percebe-se que a BChE (Figura 6, C e D) foi mais sensível pela presença de ambos os extratos e que o AC provocou maior efeito inibitório quando comparado com o CP, apresentando inibição em todas as concentrações testadas (2, 8, 14 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>). Além do mais, ao analisar os valores de IC50 nota-se que o extrato AC apresentou menor concentração de inibição quando comparado com o extrato CP na atividade de ambas as enzimas.

Assim, observa-se que os dois extratos exibem potencial para atuar como inibidores das colinesterases, o que poderia aumentar a disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica e contribuir para a transmissão do impulso nervoso e o funcionamento adequado do sistema colinérgico (SOUZA; RENNÓ; FIGUEROA-VILLAR, 2016).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Na Tabela 4 estão expostos os resultados obtidos na análise da citotoxicidade de linhagens celulares de tumores humanos e da atividade anti-inflamatória dos extratos AC e CP.

**Tabela 4** - Média  $\pm$  desvio padrão da citotoxicidade (IG50) e atividade anti-inflamatória (IC50).

<b>Citotoxicidade<sup>1</sup> (IG50, <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>		
<b>Linhagens Celulares</b>	<b>Extrato AC</b>	<b>Extrato CP</b>
<b>Câncer de pulmão</b>	>400	278,87 $\pm$ 6,10
<b>Carcinoma de mama</b>	>400	250,99 $\pm$ 8,37
<b>Carcinoma hepatocelular</b>	>400	226,75 $\pm$ 14,62
<b>Carcinoma cervical</b>	>400	314,45 $\pm$ 9,34
<b>Fígado suíno (célula primária)</b>	>400	>400
<b>Atividade anti-inflamatória<sup>2</sup> (IC50; <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>		
<b>RAW264.7</b>	>400	>400

<sup>1</sup>IG50 para elipticina 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (NCI-H460); 1,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (MCF-7), 1,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (hepG2); 0,91  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (HeLa) e 2,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (PLP2).

<sup>2</sup>Valores de IC50 correspondem a concentração de extrato responsável por 50% da inibição da produção de óxido nítrico. Valores de IC50 para a dexametasona (controle positivo): 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que a concentração estudada para o extrato AC não foi suficiente para inibir as células cancerígenas investigadas. Enquanto que o extrato CP demonstrou atividade citotóxica para todas as linhagens de tumores humanos investigadas, apresentando valores de IG50 inferiores aos relatados por Dos Santos et al. (2019) que analisaram a efetividade de nanopartículas de curcuminóides. Ainda, o extrato CP foi mais efetivo para o carcinoma hepatocelular, sendo que o IG50 obtido para essa célula foi inferior ao relatado por Silva de Sá et al. (2019) ao avaliar a citotoxicidade de dispersão sólida de curcumina.

Além do mais, a concentração analisada para ambos os extratos não afetou as células de fígado suíno (sem nenhuma patologia), demonstrando que os extratos não apresentam citotoxicidade à célula não tumoral. Ainda, na faixa de concentração testada não foi detectada atividade anti-inflamatória.

## 6 CONCLUSÃO

O extrato da casca do pinhão apresentou propriedade antioxidante significativa ao ser avaliado pelo método de DPPH, podendo atuar no controle da formação de espécies reativas de oxigênio e na diminuição da oxidação lipídica. Por meio de testes *in vitro* percebeu-se que ambos os extratos (AC e CP) atuaram como inibidores da  $\alpha$ -amilase salivar humana e pancreática suína, sendo que o extrato da casca do pinhão apresentou maior efeito inibitório quando comparado com a água do cozimento.

Os resultados da análise *in vivo* corroboram para a hipótese de que os extratos atuam como inibidores das enzimas hidrolisantes, já que ocorreu uma diminuição significativa da glicemia dos ratos que receberam os extratos quando comparado com o grupo controle.

Em relação à atividade das colinesterases, os dois extratos também atuaram como inibidores dessas enzimas, sendo que a água do cozimento do pinhão provocou maior inibição quando comparada ao extrato da casca. Assim, esses compostos residuais além de contribuírem para o tratamento de pacientes diabéticos possivelmente poderiam auxiliar na diminuição das complicações decorrentes da doença de Alzheimer.

Ainda, ambos os extratos não demonstraram citotoxicidade às células normais e o extrato proveniente da casca do pinhão apresentou atividade citotóxica à diferentes tipos de células tumorais avaliadas. Dessa forma, estes dados demonstram a bioatividade dos extratos que podem futuramente ser considerados como possível alternativa à inibição das enzimas ( $\alpha$ -amilase e colinesterases), bem como no caso, do extrato CP na atividade anti-carcinogênica, mediante estudos complementares e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, R. M. V et al. Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: *In vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5800–5806, 2011.
- AGUIAR, J.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application - The specific case of coffee antioxidants - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 21–39, 2016.
- AJAYI, O. S. et al. Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 503–506, 2019.
- ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer 's disease. **Archives of Pharmacaul Research**, v. 36, p. 375–399, 2013.
- ARALDI, C. G. et al. Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 8, 2016.
- ATASHI, F.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M. S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. **STEM CELLS AND DEVELOPMENT**, v. 24, n. 10, p. 1–43, 2015.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BICUDO, S. C. W. et al. Thermoanalytical study and characterization of native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O. Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mill). **Eletica Quimica**, v. 34, n. 1, p. 7–12, 2009.
- BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, 2009.
- BONESI, M. et al. Potential Application of *Prunus armeniaca* L. and *P. domestica* L. Leaf Essential Oils as Antioxidant and of Cholinesterases Inhibitors. **Antioxidants**, v. 8, n. 1, p. 2, 2018.
- BONILLA, J. et al. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 1–7, 2015.
- BRANCO, C. D. S. et al. Mitochondria and redox homoeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 108–118, 2015.
- BRANCO, S. et al. *Araucaria angustifolia* (Bert .) O . Kuntze induces oxidative and genotoxic damage in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera : Erebidae). **International Journal of Pest Management**, v. 60, n. 2, p. 114–120, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm.-Wiss. u-Techno.**, v. 30, p. 25–30, 1995.

CARRAZONI, T.; VIEIRA, P.; HEBERLE, M. D. A. Mechanism of the Entomotoxic Activity Induced by *Araucaria angustifolia* Methanolic Extract in Nauphoeta Cinerea Lobster Cockroaches. **Journal of Botany Research**, v. 1, n. January 2018, p. 38–49, 2017.

CASACCHIA, T. et al. Antioxidant, enzyme-inhibitory and antitumor activity of the wild dietary plant *Muscari comosum* (L.) Mill. **International Journal of Plant Biology**, v. 8, p. 31–35, 2017.

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  $\alpha$ -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.

DARYADEL, S. et al. Novel sulfamate derivatives of menthol: Synthesis, characterization, and cholinesterases and carbonic anhydrase enzymes inhibition properties. **Arch Pharm**, n. August, p. 1–9, 2018.

DASTJERDI, Z. M.; NAMJOYAN, F.; AZEMI, E. Alpha Amylase Inhibition Activity of Some Plants Extract of *Teucrium* Species. **European Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2015.

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.

DHITAL, S.; GIDLEY, M. J.; WARREN, F. J. Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by cellulose: Kinetic analysis and nutritional implications. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 305–312, 2015.

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

DONG, H. Q. et al. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase linked to type 2 diabetes. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 261–266, 2012.

DOS SANTOS, P. D. F. et al. The nanoencapsulation of curcuminoids extracted from: *Curcuma longa* L. and an evaluation of their cytotoxic, enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 573–582, 2019.

DURAIWAMY, A. et al. Development of an antidiabetic formulation (ADJ6) and its inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 3, p. 204–208, 2016.

ELLMAN, G. L. et al. A New and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

FRANCO, R. R. et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes *mellitus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, n. December 2017, p. 140–146, 2018.

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.

FURLANETTO, A. L. D. D. M. et al. Cold stress on *Araucaria angustifolia* embryogenic cells results in oxidative stress and induces adaptation : implications for conservation and propagation. **Free Radical Research**, v. 53, n. 1, p. 45–56, 2019.

GÜLÇİN, İ. et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, glutathione S-transferase, lactoperoxidase, and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1095–1101, 2016.

HABIB, M. R. et al. *In vitro*  $\alpha$ -amylase Inhibitory Potential and in Vivo Hypoglycemic Effect of Organic Extracts of *Phrynium Imbricatum* Roxb . Leaves. **Med One**, p. 1–10, 2017.

HANAFY, D. M. et al. Biophenols of mints: Antioxidant , acetylcholinesteras, butyrylcholinesterase and histone deacetylase inhibition activities targeting Alzheimer's disease treatment. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 345–362, 2017.

JUNG, H. A. et al. Inhibitory activities of major anthraquinones and other constituents from *Cassia obtusifolia* against  $\beta$ -secretase and cholinesterases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 152–160, 2016.

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, n. November 2017, p. 83–92, 2018.

KANDIMALLA, R.; THIRUMALA, V.; REDDY, P. H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1078–1089, 2017.

KOEHNLEIN, E. A. et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, n. 21, p. 512–518, 2012.

LI, Q. et al. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 294–309, 2017.

LIU, Y. et al. Competitive Inhibition Mechanism of Acetylcholinesterase without Catalytic Active Site Interaction: Study on Functionalized C60 Nanoparticles via *in Vitro* and *in Silico* Assays. **Applied Materials & Interfaces**, v. 9, p. 18626--18638, 2017.

MANOHARAN, S. et al. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease : A Mini Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–15, 2016.

MAZZUCHELLI, C. et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: A patient-centered approach. Update to a position statement of the American diabetes association and the European association for the study of diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 8, p. 140–149, 2015.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. et al. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 236–241, 2015.

MICHELON, F. et al. *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Current Nutrition & Food Science**, v. 8, p. 155–159, 2012.

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.

NAMJOYAN, F.; DASTJERDI, Z. M.; EBRAHIM AZEMI, M. Alpha Amylase Inhibition Activity of Some Plants Extract of *Teucrium* Species. **European Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2015.

NYAMBE-SILAVWE, H. et al. Inhibition of human  $\alpha$ -amylase by dietary polyphenols. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 723–732, 2015.

OLIVEIRA, R. F. et al. Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a *Pinhão* Coat (*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. **Nutrients**, v. 5, p. 5601–5614, 2015.

PANEK, D. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 676–695, 2017.

PEDROSO, I. et al. Bioaccessibility of Phenolic Compounds of *Araucaria angustifolia* from Seed Water Extracts during *In Vitro* Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food and Nutrition Sciences**, v. 9, p. 1137–1146, 2018.

PERALTA, R. M. et al. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 85–93, 2016.

PEREIRA, B. V. R.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; JONES, M. Ecotoxicology and Environmental Safety Cholinesterases characterization of three tropical fish species, and their sensitivity towards specific contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, n. February, p. 482–493, 2019.

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.

POPE, C. N.; BRIMIJOIN, S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 205–216, 2018.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 37–44, 2012.

PYAKUREL, P.; SHIN, M.; VENTON, B. J. Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) mediated dopamine release in larval *Drosophila melanogaster*. **Neurochemistry International**, v. 114, p. 33–41, 2018.

RAMAKRISHNA, R. et al. Phenolic linked anti-hyperglycemic bioactives of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars as nutraceuticals targeting type 2 diabetes. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 509–517, 2017.

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.

RAWSHANI, A. et al. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 15, p. 1407–1418, 2017.

RIBEIRO, R. M.; SANTOS, A. J. DOS; BITTENCOURT, A. A política de garantia de preços mínimos para o pinhão. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 35, n. 84, p. 459, 2015.

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.

ROCHA, F. et al. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. **Food and Function**, p. 1–30, 2018.

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

SEMAAN, D. G. et al. In vitro anti-diabetic activity of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on PTP1B, DPPIV, alpha-glucosidase and alpha-amylase enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 39–46, 2017.

SENTHIL, S. L. et al. *In vitro* and in silico inhibition properties of fucoidan against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -D-glucosidase with relevance to type 2 diabetes mellitus. **Carbohydrate Polymers**, v. 209, p. 350–355, 2019.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; REMIZE, F.; POUCHERET, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. **Food Research International**, v. 104, p. 86–99, 2018.

SHAH, M. et al. Phytochemical screening, Antioxidant, Thrombolytic,  $\alpha$ -amylase inhibition and cytotoxic activities of ethanol extract of *Steudnera colocasifolia* K. Koch leaves. **Journal Young Pharm.**, v. 8, n. 4, p. 391–397, 2016.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHIN, M.; VENTON, B. J. Electrochemical Measurements of Acetylcholine-Stimulated Dopamine Release in Adult *Drosophila melanogaster* Brains. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 10318–10325, 2018.

SHOBANA, S.; SREERAMA, Y. N.; MALLESHI, N. G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1268–1273, 2009.

SILVA, C. M. DA et al. Extraction of oil and bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze using subcritical n-propane and organic solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 112, p. 14–21, 2016.

SILVA DE SÁ, I. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of enzymatic and antioxidant activity, cytotoxicity and genotoxicity of curcumin-loaded solid dispersions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 29–37, 2019.

SINGH, M. et al. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 165–188, 2013.

SOUZA, L. G. DE; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Chemico-Biological Interactions Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. v. 254, p. 11–23, 2016.

SOUZA, M. O. et al. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. p. 24–37, 2014.

STOJKOVIC, D. et al. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 100–103, 2019.

SUN, L.; GIDLEY, M. J.; WARREN, F. J. The mechanism of interactions between tea polyphenols and porcine pancreatic alpha-amylase: Analysis by inhibition kinetics, fluorescence quenching, differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 10, p. 1–13, 2017.

SURAI, P. Antioxidant Action of Carnitine: Molecular Mechanisms and Practical Applications. **EC Veterinary Science**, v. 2, p. 66–84, 2015.

SVIHUS, B.; HERVIK, A. K. Digestion and metabolic fates of starch, and its relation to major nutrition-related health problems: A review. **Starch/Staerke**, v. 68, n. 3, p. 302–313, 2016.

TAYLOR, P.; POHANKA, M. Cholinesterases in Biorecognition and Biosensors Construction: A Review. **Analytical Letters**, v. 46, n. 12, p. 37–41, 2013.

TONG, L. et al. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 18–25, 2015.

TSANAKTSIDIS, C. G. et al. Natural resins and their application in antifouling fuel technology: Part I: Improving the physicochemical properties of diesel fuel using natural resin polymer as a removable additive. **Fuel Processing Technology**, v. 114, p. 135–143, 2013.

UDDIN, S.; MAMUN, A.; AKTER, F. Exploring the Effect of *Phyllanthus emblica* L. on Cognitive Performance, Brain Antioxidant Markers and Acetylcholinesterase Activity in Rats: Promising Natural Gift for the Mitigation of Alzheimer's Disease. **Annals of Neurosciences**, v. 23, p. 218–229, 2016.

ULLAH, A. Diabetes *mellitus* and oxidative stress — A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

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.

WICKRAMARATNE, M. N.; PUNCHIHEWA, J. C.; WICKRAMARATNE, D. B. M. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenanthera pavonina*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 2016.

WIWANITKIT, V. Diabetes type 3: A brief review. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 2, n. 3, p. 223–226, 2008.

YAMAMOTO, S.; OTTO, A.; SIMONEIT, B. R. T. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 11, p. 1337–1347, 2004.

ZHAO, C. et al. Bioactive compounds from marine macroalgae and their hypoglycemic benefits. **Trends in Food Science and Technology**, v. 72, p. 1–12, 2018.

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.