

Extração e Determinação de Flavonóides, Taninos Condensados e Totais da casca do pinhão (*Araucaria angustifolia*)

Eduarda Ramos Albuquerque⁽¹⁾; Sheili Chaves Gossler⁽²⁾; Marcel Piovezan⁽³⁾;
Leilane Costa de Conto⁽⁴⁾;

⁽¹⁾ Aluna do curso Técnico em Análises Químicas; Instituto Federal de Santa Catarina; Lages, Santa Catarina; duda.ramos440@gmail.com;

⁽²⁾ Aluna do curso Técnico em Análises Químicas; Instituto Federal de Santa Catarina; Lages, Santa Catarina; sheili_gossler_c@hotmail.com Professor orientador; Instituto Federal de Santa Catarina; Lages, Santa Catarina;

⁽³⁾ Professor Orientador; Instituto Federal de Santa Catarina; Lages, Santa Catarina; marcel.piovezan@ifsc.edu.br.

⁽⁴⁾ Professora Colaboradora; Instituto Federal de Santa Catarina; Lages, Santa Catarina; leilane.conto@ifsc.edu.br.

RESUMO: O pinhão é a semente da *Araucaria angustifolia*, árvore típica da região sul. A casca *in natura* do pinhão apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos como taninos e flavonóides. Com o intuito de encontrar a maneira que possibilite uma melhor extração de taninos e flavonóides da casca do pinhão, de forma barata e rápida, o trabalho tem como objetivo avaliar as condições mais adequadas para essa extração. Para isso, utilizou-se a casca do pinhão crua e cozida, que foi seca e triturada, para cada processamento foram utilizados três tipos de solventes extratores: aquoso, hidroetanólico e metanol/acetona. Para essas extrações foram aplicados os métodos de Stiasny para taninos condensados, de Makkar para taninos totais, além do método de Zhishen para extração de flavonóides. Os flavonóides determinados apresentaram uma maior concentração na casca de pinhão crua com valores de 23,41 g/L com o solvente metanol/acetona e 23,09 g/L com o solvente hidroetanólico, no quesito de viabilidade o solvente indicado para a extração é o hidroetanólico, os taninos condensados também apresentaram maior concentração na casca crua com o solvente hidroetanólico com valor de: 58,28%. Os taninos totais apresentaram uma maior concentração quando extraídos com o solvente hidroetanólico e com a casca crua com valor de 1,348%. A casca cozida não foi tão eficiente devido os compostos fenólicos presentes migrarem para a água de cozimento ou incorporarem à semente do pinhão.

Palavra Chave: solventes extratores, compostos fenólicos.

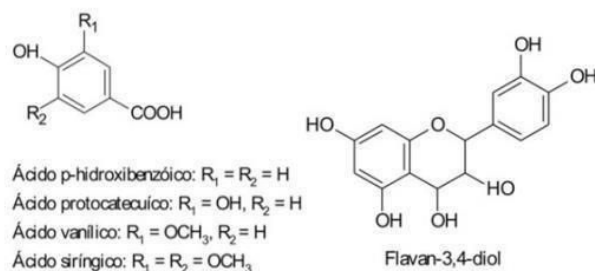
INTRODUÇÃO

O pinhão é a semente da *Araucaria angustifolia*, árvore típica da região sul, possui um alto valor nutricional e de reservas energéticas, é fonte de amido e de fibras alimentares e possui baixo teor de gordura, além de ser uma boa fonte de compostos bioativos. A casca *in natura* do pinhão apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos que migram da casca para o endosperma durante o cozimento. (DAROLT; HELM, 2013).

Compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Os principais compostos fenólicos são flavonoides, antocianinas, catequinas, taninos (polifenóis) e ácidos fenólicos (fenóis simples) (ARAÚJO, 2011; ANGELO & JORGE, 2007).

O principal grupo de compostos fenólicos presentes no revestimento do pinhão são os taninos condensados e hidrolisáveis de alto peso molecular, compostos estes que possuem maior atividade antioxidante que os compostos fenólicos simples (KOEHNLEIN et al., 2012; THYS & CUNHA, 2015).

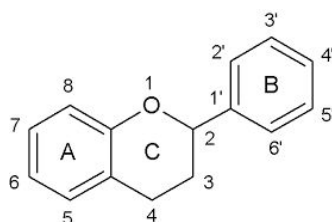
Figura 1: Estrutura química de alguns compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Angelo e Jorge (2007)

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram -se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos (substâncias químicas formadas pela união de moléculas de glicídios) ou agliconas (agrupamentos não glicídicos). São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆ (TAYLOR & FRANCIS, 1999).

Figura 2: Estrutura base dos flavonoides

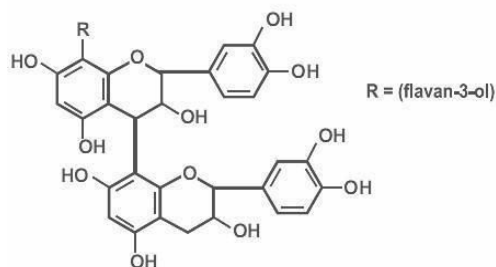


Fonte: Thais Nogueira (2015)

Swain & Bate-Smith citados por Sarkar & Howarth (1976) definem taninos como compostos fenólicos poliméricos solúveis em água, com peso molar entre 500 e 3000 Da. As principais características dessa classe de compostos são: solubilidade em água, exceto os de elevado peso molecular; possuem a habilidade de ligar-se a proteínas, combinar-se com celulose e pectina para formar complexos insolúveis (PINTO, 2003).

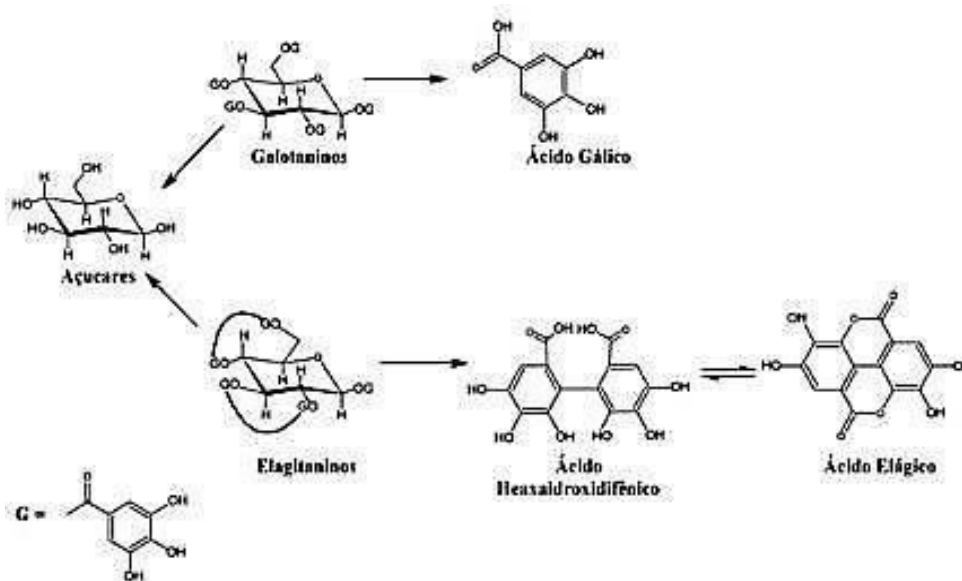
Os taninos são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados, que compõe os taninos totais. Os taninos condensados possuem estrutura flavonóidica e através de sua condensação formam proantocianidinas (polímeros do tanino). Podem conter de duas a cinquenta unidades flavanóides; possuem estruturação complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura (MARTINEZ, 1996; DUTRA,1997).

Figura 3: Estrutura do tanino condensado 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucose (PGG)



Fonte: Gama, A. P (2011)

Figura 4: Esquema de formação de taninos hidrolisáveis



Fonte: Janaci Santos(2010)

Os taninos hidrolisáveis são constituídos por poliésteres de ácido gálico e diferentes carboidratos; são unidos por ligações éster-carboxila. A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliálcool, usualmente D-glucose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotanninos) ou pelo hexadihidroxifenílico (elagitaninos). Esses taninos são hidrolisáveis por ácidos, bases e enzimas em suas unidades formadoras, sendo divididos em galotanninos e elagitaninos. (BATTESTIN, 2004).

Segundo Trugilho *et al* (1997), os taninos ocorrem amplamente nos vegetais, porém, sua extração comercial é realizada através da casca e, ou, do cerne da madeira. O tanino é extraído dos vegetais por diversos solventes tais como água, acetona, etanol ou por soluções aquosas com alguns sais como sulfito de sódio, carbonato de sódio, entre outros (GUPTA, 1981).

Alguns métodos para determinação de taninos incluem gravimetria, métodos de ligação e precipitação com proteínas. A dificuldade dessas análises e de suas interpretações ocorre porque a maioria dos métodos mede taninos não em termos absolutos, mas em relação a padrões, por exemplo, ácido tânico e ácido gálico (NOZELLA, 2001). Os métodos gravimétricos foram desenvolvidos para tentar se resolver o problema do uso de padrões (MAKKAR *et al.*, 1993), mas

também dependem da eficiência da extração. No método de Stiasny, os componentes fenólicos reagem com formaldeído, em meio ácido, e são condensados (GUANGCHENG et al 1991) . Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo estudar e avaliar as condições necessárias e mais adequadas para a extração e determinação de flavonóides e taninos totais e condensados da casca do pinhão (*araucaria angustifolia*), para isso foram realizados testes com diferentes solventes extratores como a água, metanol, etanol e acetona e com diferentes preparos da amostra (casca crua e cozida), além de determinar a concentração de taninos condensados e totais e de flavonóides.

METODOLOGIA

Matéria Prima

As amostras de pinhão foram adquiridas no comércio local e congeladas durante oito meses. Após isso, as amostras foram descongeladas para posteriormente serem preparadas.

Preparo das amostras

As amostras foram preparadas de duas formas. Na primeira descascou-se os pinhões para que se obtivesse a casca crua, essas foram secas em estufa à 35°C por 48 horas e trituradas para se obter uma menor granulometria. Na segunda amostra, os pinhões foram cozidos, foi obtida a casca que posteriormente foi seca em estufa à 35°C durante 48 horas e trituradas.

Preparo dos extratos

Foram preparados seis extratos, três com a casca crua e três com a casca cozida. Os extratos com a casca crua e cozida foram feitos com água, etanol/água v:v (75 ml de água e 75 ml de etanol) , acetona/metanol v:v (75 ml de acetona e 75 ml de metanol) na proporção de 15 g de casca e 150 mL de solvente, totalizando os seis extratos. As amostras foram deixadas em repouso por 48 horas e após isso, filtradas e transferidas para seis frascos âmbar, ilustrados abaixo:

Figura 5: Frascos âmbar contendo os extratos



Fonte: Autores, 2017

Respectivamente:

Frasco 1: Extrato aquoso casca crua

Frasco 2: Extrato hidroetanólico casca cru

Frasco 3: Extrato metanol/acetona casca cru

Frasco 4: Extrato aquoso casca cozida

Frasco 5: Extrato hidroetanólico casca cozida

Frasco 6: Extrato metanol/acetona casca cozida

Determinação da composição centesimal

Para a determinação da composição centesimal da casca crua e cozida do pinhão, as análises de umidade, cinzas e proteínas foram determinadas segundo as metodologias da AOAC (2000). A determinação de lipídeos seguiu a metodologia de Bligh-Dyer (1959). As proteínas foram quantificadas através do método de Kjeldahl, por meio do nitrogênio total. A umidade foi determinada por dessecação em estufa simples. As cinzas totais foram determinadas por via seca. O cálcio foi determinado por volumetria de complexação e a fibra bruta por digestão ácido básica, sendo que as técnicas recomendadas para desengordurar seguiram a metodologia de Soxhlet ou Bligh-Dyer. O cálculo de carboidratos totais foi realizado por diferença.

Determinação dos Flavonóides Totais

O método utilizado para a determinação de flavonóides totais seguiu a metodologia proposta por (ZHISHEN, 1999). No início foi necessário fazer uma curva de calibração que serviu de referência para os posteriores resultados das amostras. Feita da seguinte forma: transferiu-se volumes (20 a 250 μL) da solução padrão (epicatequina 1080 mg L^{-1}) para um tubo de ensaio, seguido de adição de 4 mL de água deionizada e 300 μL de solução 5 % (m/v) de NaNO_2 deixou-se em repouso por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se 300 μL de solução aquosa 10 % de AlCl_3 (m/v), deixou-se em repouso por 5 minutos e adicionou-se 2 mL de solução 1 mol L^{-1} de NaOH . Realizaram-se medidas em espectrofotômetro de UV visível em comprimento de onda de 510 nm. Após a curva de calibração seguiu-se a mesma metodologia com os extratos da amostra, observando que as amostras necessitaram de diluição, ou seja, ao invés de transferir 1 mL da amostra transferiu-se 50 μL da mesma, os passos seguintes foram realizados da mesma forma. De acordo com a concentração do padrão de flavonóides preparado (1080 mg L^{-1}) calculou-se a concentração de cada ponto da curva de calibração considerando o volume final de 1000 μL (1 mL). Um gráfico de $\text{Abs} \times [\text{flavonóide padrão}]$ foi construído e gerado a equação da reta, o R^2 . Foi quantificado o teor de flavonóides totais de acordo com a equação da reta.

Determinação dos Taninos Condensados

Para a determinação de taninos condensados foi adaptada a metodologia proposta por (WISSING, 1955). Colocou-se uma alíquota de 10 mL de cada extrato em um balão de fundo redondo de 100 mL, com adição de 0,8 mL de formaldeído (37%) e 0,2 mL de ácido clorídrico concentrado, sendo mantida em fervura ($100 \text{ }^\circ\text{C}$), sob refluxo e agitação constante durante 30 min. Posteriormente filtrou-se o precipitado do balão com papel-filtro (que foi previamente seco e pesado). É necessário fazer a secagem do papel filtro para que não haja a interferência da umidade durante a pesagem. O papel-filtro, juntamente com o precipitado contido no balão, após a filtragem, foram submetidos à secagem ($103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) até obtenção de massa constante, anotou-se a massa, sendo calculado o teor de taninos condensados através da equação abaixo. O teor de sólidos solúveis não-tânicos (branco) foi obtido através da secagem de 10 mL de cada amostra em estufa e anotado o seu peso após a secagem.

$$\text{TTS \%} = (\text{Map} / \text{Mae}) \cdot 100$$

Em que:

TTS % = Teor de taninos condensados pelo método de Stiasny, em %;

Map = Massa anidra do precipitado extrapolado para o volume total de extrato (0,15 L);

Mae = Massa anidra da amostra utilizada na extração, em g.



Determinação de Taninos Totais

A determinação de taninos totais foi adaptada da metodologia de MAKKAR(1992). Inicialmente foi necessário preparar o PVP (polivinilpirrolidona), para que o mesmo fosse ativado. Para esse procedimento, foi preparada uma solução aquosa supersaturada de NaCl, em seguida adicionou-se 5mL de HCl 5%, esperou-se que o excesso de sal decantasse, transferiu-se o sobrenadante para outro béquer e adicionou-se o PVP em uma quantidade suficiente para formar um material viscoso. Pegou-se cerca de 14 mL de cada um dos seis extratos preparados e dividiu-se em duas porções de 12 mL e 2 mL. Adicionou-se PVP cerca de (1,2 g, 50 mg mL⁻¹) que foi tratado anteriormente, à primeira porção de 12 mL, após isso diluiu-se a mesma 1:1 com água destilada, a mistura foi agitada durante 15 minutos à 4°C, centrifugou-se e recolheu-se o sobrenadante. Alíquotas de 4 mL deste extrato tratado com PVP (m2), foram transferidas para um béquer e secas em estufa à 100 °C por 60 min. A porção de 2 mL não tratada (m1) foi seca em estufa à 100 °C durante 30 min. Os béqueres foram transferidos para um dessecador e pesados à temperatura ambiente. Esse procedimento de secagem das alíquotas e pesagem foi repetido três vezes para cada extrato. O cálculo dos taninos totais foi feito através da seguinte fórmula:

$$\%TT = \frac{[(m1) - (m2 - m3)] \cdot V \text{ extrato}}{V \text{ alíquota usada}}$$

Onde:

m1: massa de extrato não tratado referente a 2 mL

m2: massa do extrato tratado com PVP ;

m3: massa do branco do PVP

V extrato: 150 mL de extrato preparado

V alíquota: 2 mL

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Composição Centesimal

Os resultados de umidades, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos fibra alimentar e cálcio estão expostos na Tabela 1. A partir dos parâmetros analisados observou que houveram diferenças entre as formas de preparo da casca do pinhão utilizadas. Abaixo tabela 1:

Tabela 1: Composição centesimal da casca do pinhão crua e cozida

AMOSTRA	UMIDADE (%)	CINZAS (%)	PROTEINAS (%)	LIPIDEOS (%)	CARBOIDRATOS (FIBRAS) (%)	Ca e Mg (mg)
Casca Pinhão Crua	52,92 ± 0,15	2,19 ± 0,20	2,48 ± 0,01	1,09 ± 0,00	41,31 ± 0,00	340 ± 0,00
Casca Pinhão Cozida	62,92 ± 0,25	2,00 ± 0,10	2,56 ± 0,19	0,81 ± 0,01	31,82 ± 0,12	360 ± 0,01

Fonte: Autores, 2017

Obs: Composição centesimal em base seca.

Como a análise da composição centesimal, em resíduos de pinhão como a casca, é um assunto relativamente novo a ser pesquisado, os dados obtidos da análise dificilmente podem ser comparados com outros resultados, demonstrando assim a pesquisa realizada como umas das primeiras discussões com relação a esse assunto.

Inicialmente com relação a umidade, a mesma se mostrou maior na casca de pinhão cozida e isso se reflete no tipo de processamento, já que conforme este método a casca do pinhão foi cozida com água. Relembrando que ambas as cascas, tanto cozidas e cruas, foram secas em estufa à 35 °C por 48 horas.



Quanto às cinzas, em comparação aos dois tipos de preparo, tanto a casca crua quanto à cozida apresentaram um valor relativamente próximo, ou seja, a diferença no processamento de ambas não interferiu no valor de cinzas.

Os valores de proteínas foram muito semelhantes, tendo uma diferença muito pequena. Logo, a diferença no tipo de preparo não interferiu na quantidade desse composto.

Os valores de lipídios variaram significativamente, tendo uma maior quantidade na casca de pinhão crua, sendo esse resultado esperado devido ao processo de cozimento que fez com que o teor de lipídeos na casca diminuísse devido a degradação desta molécula.

Os carboidratos apresentaram valores com pouca diferença, onde a casca crua apresentou maior teor desse composto, justificado devido a tipo de processamento.

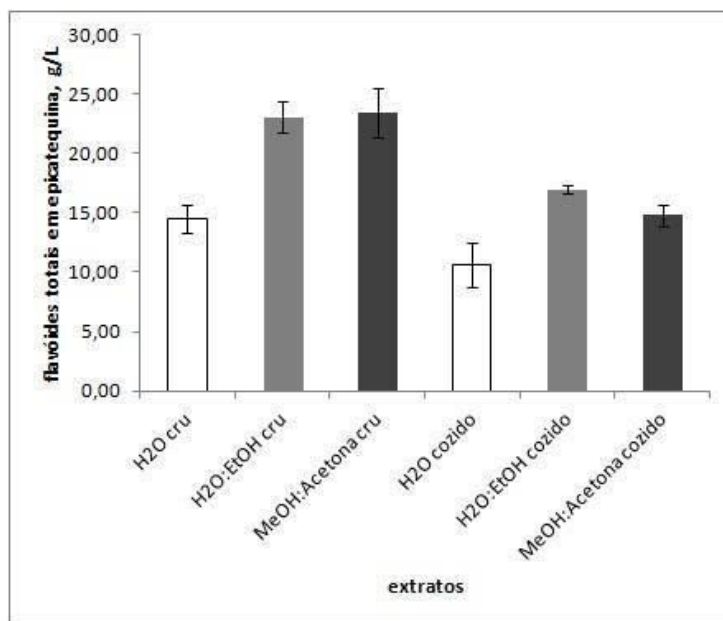
Devido ao fato da casca não possuir significativamente carboidratos digeríveis, obtém-se que a quantidade de carboidratos e fibras é semelhante e considerada a mesma.

Os valores de cálcio não apresentaram muita diferença, porém a casca de pinhão crua, apresentou uma maior quantidade de cálcio, sendo assim o processamento interferiu na quantidade desse composto, devido ao cozimento e calor terem o degradado.

Flavonóides totais

De acordo com a curva de calibração na faixa de concentração de 21,6 - 216 mg/L. A equação da reta: $y = 0,0039x + 0,01$ e $R^2 = 0,9905$. As amostras após quantificação e correção pela diluição foi calculada a média da triplicata de preparo e expresso o desvio padrão como barras apresentadas para cada tipo de extrato. Abaixo a figura 6 com os resultado de flavonóides:

Figura 6: Concentração de flavonóides totais na casca de pinhão crua e cozida



Fonte: Autores, 2017

Os extratos que apresentam maiores teores de eficiência para a extração dos flavonóides são o hidroetanólico (23,09 g/L) e o metanol/acetona (23,41 g/L), sendo mais viável utilizar o primeiro solvente devido ao preço e a menor toxicidade.

De acordo com os resultados expressos em (g/L), observou-se que o processo de cozimento da casca fez com que o teor de flavonóides diminuísse independente do solvente utilizado. Isso ocorre devido ao fato deste composto migrar da casca para a água de cozimento ou até mesmo para o pinhão, ou ainda pela degradação da molécula de flavonóide. A casca crua mostrou-se mais eficiente para esse tipo de extração.

A Tabela 2 apresentada abaixo, mostra uma comparação dos desvios-padrão para cada par de amostras:

Tabela 2: Comparação entre extratos para flavonóides totais

Comparação	Sigma 1	Sigma 2	F-Ratio	P-Value
Prep 1/ Prep 2	1,12757	1,36373	0,683637	0,8121
Prep 1/ Prep 3	1,12757	2,07932	0,294063	0,4545
Prep 1/ Prep 4	1,12757	1,82307	0,382541	0,5534
Prep 1/ Prep 5	1,12757	0,374506	9,06498	0,1987
Prep 1/ Prep 6	1,12757	0,864786	1,70007	0,7407
Prep 2/ Prep 3	1,36373	2,07932	0,430144	0,6015
Prep 2/ Prep 4	1,36373	1,82307	0,559567	0,7176
Prep 2/ Prep 5	1,36373	0,374506	13,2599	0,1403
Prep 2/ Prep 6	1,36373	0,864786	2,4868	0,5736
Prep 3/ Prep 4	2,07932	1,82307	1,30088	0,8692
Prep 3/ Prep 5	2,07932	0,374506	30,8267	0,0628
Prep 3/ Prep 6	2,07932	0,864786	5,78131	0,2949
Prep 4/ Prep 5	1,82307	0,374506	23,6968	0,081

Fonte: Autores, 2017

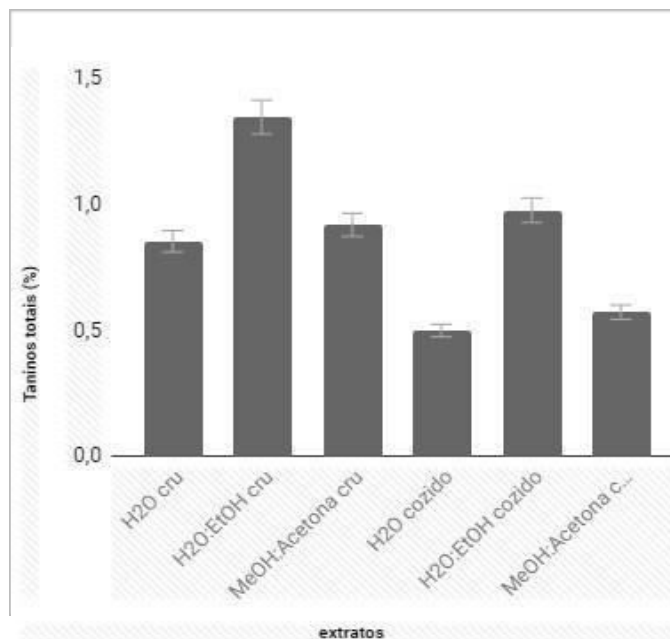
A estatística exibida nesta tabela testa a hipótese nula de que os desvios padrão dentro de cada uma das 6 preparações (Prep 1 - 6) é igual. De particular interesse é o valor P. Uma vez que o valor P, que quando maior ou igual a 0,05, denota não haver diferença estatisticamente significativa entre os desvios-padrão no nível de confiança de 95% entre as diferentes preparações.

Os valores de P abaixo de 0,05 não foi constatado nenhum, indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os dois sigmas no nível de significância de 5%.

Taninos Totais

Abaixo está a Figura 7 com os resultados obtidos da quantidade de taninos totais na casca crua e cozida conforme o extrato utilizado:

Figura 7: Concentração de taninos totais na casca de pinhão crua e cozida



Fonte: Autores, 2017

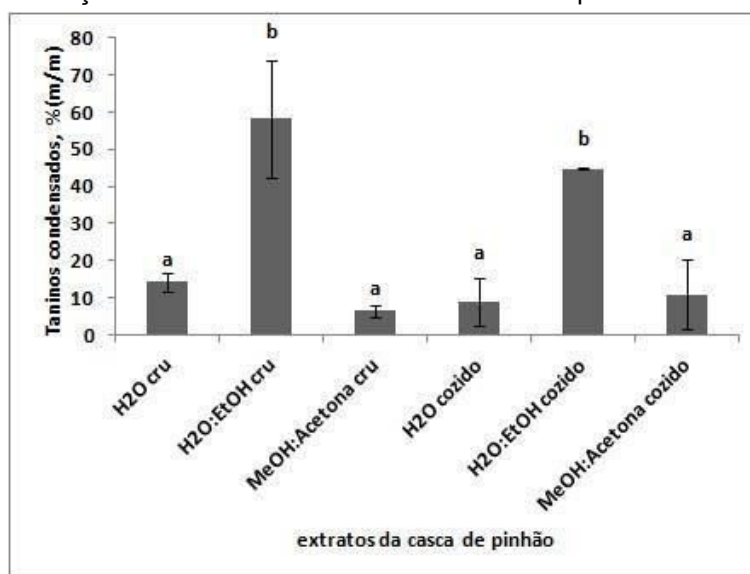
Conforme o gráfico, o solvente que demonstrou maior potencial de extração de taninos totais foi o hidroetanólico tanto na casca crua quanto na casca cozida, porém na casca crua a quantidade extraída de taninos totais foi maior com o valor de 1,348%, se mostrando assim mais eficaz.

O extrato metanol/acetona se mostrou intermediário em ambos os tipos de preparo em comparação com os outros extratos, isso se deve a sua concentração forte que potencialmente degradou os taninos que estavam na casca. Já o extrato apenas com água teve o resultado esperado, demonstrando ser o solvente menos eficaz para a extração desse tipo de composto.

Taninos Condensados

A partir do método utilizado para a determinação de taninos condensados e da equação para expressar a porcentagem de taninos condensados nas amostras, foram obtidos os seguintes resultados expressos na figura 8:

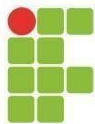
Figura 8: Concentração de taninos condensados na casca de pinhão crua e cozida.



Fonte: Autores, 2017

De acordo com a Figura 2, foram identificados 2 grupos homogêneos, identificados com as letras "a" e "b". As preparações com mesma letra formam um grupo dentro do qual não há diferenças estatisticamente significativas. Com letras diferentes diferem significativamente com 95 % de significância. O método utilizado para discriminar entre os solventes de extração é o procedimento de menor diferença significativa (LSD) de Fisher. Assim, o método mais eficiente para a determinação dos taninos condensados foi a extração da casca crua com o solvente hidroetanólico com valor de 58,28%. O baixo valor de taninos condensados para o extrato metanol/acetona se deve ao fato de que a acetona pode interagir com os taninos degradando essa molécula.

Os taninos totais se subdividem em taninos condensados e hidrolisáveis, logo as concentrações determinadas de taninos condensados estão incluídas nos valores dos taninos totais na casca do pinhão. Ou seja, o valor de 58,28% de taninos condensados determinados na casca crua com o solvente hidroetanólico estão incluídos em 1,348% dos taninos totais que foram determinados da mesma maneira.



CONCLUSÕES

Os diferentes tipos de processamento utilizados possibilitaram a avaliação do melhor procedimento a ser utilizado com a matéria prima, sendo comprovado que a casca do pinhão crua, para a determinação dos compostos desejados, se mostrou mais eficaz do que a casca cozida. Além disso observou-se que alguns solventes como a acetona, podem interagir com as moléculas que se desejam extrair causando interferência nos resultados.

O solvente que se apresentou mais eficaz para a extração dos flavonóides foi o hidroetanólico, sendo viável utilizá-lo para essa determinação, uma vez que, o etanol é um solvente barato e que não apresenta alta toxicidade. Apesar do metanol/acetona também ter apresentado bons resultados, o seu uso, com relação aos solventes estudados, seria dispensado.

Para os taninos condensados observou-se que o melhor solvente extrator foi o hidroetanólico com a casca crua. Os valores obtidos para a casca cozida também foram altos, porém a ausência de estudos com relação a esse procedimento na matéria prima utilizada impossibilitaram que fosse feita uma comparação de resultados.

Os taninos totais representaram um resultado semelhante as outras análises indicando que em relação a solvente extrator o hidroetanólico foi mais eficiente e em relação ao tipo de preparo, a casca crua.

As análises realizadas permitiram avaliar diferentes metodologias para determinar compostos fenólicos como taninos condensados e totais e flavonóides na casca do pinhão. Esses métodos ainda não haviam sido usados para avaliar esses compostos nessa matéria prima, não sendo possível comparar os resultados com outros estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter nos dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos nossos familiares pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao Instituto Federal Campus Lages, seu corpo docente entre técnicos de laboratório, direção e administração que auxiliaram e oportunizaram o desenvolvimento deste trabalho.

A nosso orientador Marcel Piovezan pela paciência, orientações, correções, incentivos e suporte durante todo o período da pesquisa.

A professora colaboradora Leilane Costa de Conto pelo auxílio material na pesquisa.

E o agradecimento a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, o nosso muito obrigado!

REFERÊNCIAS

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos Fenólicos em Alimentos - Uma Breve Revisão**. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), v. 66, p. 01-09, 2007.

BATTESTIN, Vania; MATSUDA, Luis Katsumi. FONTES E APLICAÇÕES DE TANINOS E TANASES EM

ALIMENTOS. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p.63-72, out. 2004. Disponível em:

<<http://sv-bib.fcfar.unesp.br/seerer/index.php/alimentos/article/view/58/75>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

CARVALHO, A. G. et al. **Isolamento e identificação de compostos fenólicos em folhas de Eugenia uniflora L.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013, 44p. 2013. Acesso em: 17 nov.2016.

DAROLT, L. M.; HELM, C. V. **Caracterização da composição química e compostos fenólicos do pinhão**. Anais do XI Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas. 2012. Acesso em: 17 nov.2016.

DA COSTA LEITE, D. M. **Avaliação Nutricional da Semente do Pinheiro-do-Paraná (Araucaria angustifolia)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007, 60p.

DOAT, J. **Les tanins dans les bois tropicaux. Bois et forêts des tropiques, Nogent-sur Marne**, v. 182, p.35-7, 1978.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p. 181-207, 1982

GAMA, T. M. M. T. B. **Estudo Comparativo dos Aspectos Físico-Químicos do Pinhão Nativo e do Pinhão Proveniente de Processos de Polinização Controlada de Araucaria Angustifolia e da Influência do Tratamento Térmico**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016, 90p.

GUANGCHENG, Z, YUNLU.L,YAZAKI, Y. **Extractive yields, Stiasny values and polyflavanoid contents in barks from six acacia species in Australian**. Australian Forestry, Canberra, v.3, n.54, p. 154-156, 1991.

HERGERT, H.L. **Condensed tannins in adhesives: introduction and historical perspectives**. In: HEMINGW AY, R.W . et al. (Eds.) Adhesives from renewable resources . Washington, D.C.: American Chemical Society, 1989. p. 155-171. (ACS Symposium). Acesso em: 17 nov. 2016.

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, 2016.

MAKKAR, Harinder P S et al. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 61, n. 2, p.161- 165, 30 out. 1992. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740610205>.

Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740610205/abstract>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

MARTINEZ, F. L. **Taninos Vegetais e suas aplicações.** Universidade de Havana/Cuba. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Outubro de 1996.

PANSHIN, A.J.; HARRAR, E.S.; BETHEL, J. S.; BAKER, W. J. **Forest products: their sources, production, and utilization.** 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1962. 538p.

PINTO, G.A.S. **Produção de Tanase por *Aspergillus niger*.** 2003. 213f. Tese (Doutorado)-UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

SARTORI, Caroline Junqueira. **AVALIAÇÃO DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS**

CASCAS DE *Anadenanthera peregrina* (ANGICO-VERMELHO). 2012. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012

SOUZA, V. R. et al. **Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits.** Food Chemistry, v. 134, p. 381-386, 2012.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. **The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*.** Journal Science Food Agriculture. London, v.10, p.135-144, 1959.

WISSING, A. **The utilization of bark II: Investigation of the stiasny-reaction for the precipitation of polyphenols in Pine bark extractives.** Svensk Papperstidning 58(20): 745- 750, 1955.

ZHISHEN J, Mengcheng T, Jianming W (1999) **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** Food chemistry 64: 555-559. doi: 10.1016/S0308- 8146(98)00102-2