

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto Sensu*
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CLEOCI BENINCA

AMIDO DA SEMENTE DA *Araucaria angustifolia*: CARACTERIZAÇÃO E EFEITO
DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICA E FÍSICA E DA INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS
DA CASCA DE PINHÃO NAS SUAS PROPRIEDADES

PONTA GROSSA
2019

CLEOCI BENINCA

AMIDO DA SEMENTE DA *Araucaria angustifolia*: CARACTERIZAÇÃO E EFEITO
DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICA E FÍSICA E DA INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS
DA CASCA DE PINHÃO NAS SUAS PROPRIEDADES

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler

Coorientadora: Dra. Radla Zabian Bassetto Bisinella

PONTA GROSSA

2019

B467 Beninca, Cleoci
Amido da semente da *Araucaria angustifolia*: caracterização e efeito das modificações química e física e da incorporação de extratos da casca de pinhão nas suas propriedades / Cleoci Beninca. Ponta Grossa, 2019.
165 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler.

Coorientadora: Profa. Dra. Radla Zaban Bassetto Bisinella.

1. Amido não convencional. 2. Fosfatação. 3. Moinho de bolas. 4. Análise térmica. 5. Propriedades de pasta. I. Schnitzler, Egon. II. Bisinella, Radla Zaban Bassetto. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. IV.T.

CDD: 664.2

TERMO DE APROVAÇÃO

CLEOCI BENINCA

AMIDO DA SEMENTE DA *Araucaria angustifolia*: CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICA, FÍSICA E DA INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO NAS SUAS PROPRIEDADES

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Egon Schnitzler - UEPG - PR



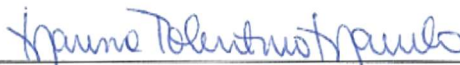
Profª. Drª. Maria Bertília Oss Giacomelli - IFSC - SC



Prof. Dr. Tiago André Denck Colman - UFGD - MS



Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate - UEPG - PR



Profª. Drª. Marina Tolentino Marinho - UEPG - PR

Ponta Grossa, 29 de outubro de 2019.

Dedico especialmente à família que Deus me concedeu,
Almir e Geovanna, e a todos aqueles que desejam e
lutam para deixar ‘boas sementes’ às futuras gerações.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser ‘Aquele que É’, por ter me permitido reencontrá-lo na Eucaristia durante este período no qual estive no doutorado. Por ter nos dado uma comunidade (Santa Edwiges) tão acolhedora para servi-lo. À Maria Santíssima pelas inúmeras graças recebidas pela sua poderosa intercessão, e por nunca ter deixado faltar ‘vinho’ para a minha família.

Agradeço ao Almir, meu esposo e melhor amigo, por todos os momentos que compartilhamos, por me ajudar a crescer na fé, por dedicar-se a família e ser um excelente pai para a nossa filha. E a este ‘presente de Deus’, cujo nome é Geovanna, por ter alegrado os meus dias e me ensinado o mais profundo e verdadeiro sentido da palavra amar.

Aos meus pais, Edinarte e Izonete, por terem me deixado o maior legado: o incentivo para aprender sempre.

Aos demais membros da minha família, irmão, cunhada e sobrinha; às filhas, netos e genros (do Almir e meus) por celebrarem comigo mais esse passo dado.

A Eliana, que foi (e é) muito mais que uma psicóloga para mim, por ter me orientado e conduzido para que eu encontrasse o amor próprio e o ressignificado de muitas coisas em minha vida.

As minhas amigas-irmãs Ana Mery e Marina, pelas confidências que partilhamos, pelo carinho e convívio comigo e com minha família.

Aos Begha pela amizade imensurável e aos Messias pela companhia de sempre.

Ao Ministério Força e Vitória por ter sido canal de graça e restauração em minha vida.

Ao professor Egon Schnitzler, por dividir seu tempo, experiência e conhecimento com todos (utilizando a forma mais humilde que eu já vi), por ter confiado em mim e por tornar esse processo leve.

À Cristina, Camila e Radla por terem me ensinado tanto e pela parceria em todos os momentos do doutorado, inclusive na hora dos cafés (porque primeiro vem a obrigação).

À Raíssa, Stephanie, Alana e Thayla, pelas incontáveis horas de trabalho, papos e risadas.

À Francine, pela presença sutil e marcante em minha vida.

Aos professores Tiago e Ivo pela colaboração em todas as etapas dessa caminhada.

Agradeço especialmente ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC), por ter gerenciado meios para que os servidores possam usufruir de afastamento para capacitação. E à professora Maria Bertília Oss Giacomelli, por ter encarado ‘fortemente’ a implantação do campus Canoinhas, e pelo apoio e incentivo que sempre me deu.

À Marli da Silva Santos, professora do IFSC, por ser tão prestativa e acolhedora especialmente no período final deste doutorado.

Aos servidores da Flona, Carlos e ao 'Neco', por terem sido sempre tão parceiros e prestativos na coleta dos pinhões.

À UEPG (Programa de Pós-graduação, Departamento de Engenharia de Alimentos e Labmu), pela estrutura física e humana as quais colaboraram imensamente com a minha formação profissional.

Ao professor Ricardo António Esteves Castro, da Universidade de Coimbra, que mesmo sem me conhecer foi tão solícito e abriu as portas da Instituição para futuras parcerias.

Ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (Uniedu) pelo aporte financeiro concedido durante o período de doutorado.

*“Tudo o que fazemos é meramente importante;
só Deus é necessário”.*

(Pe Joãozinho - SCJ, outubro de 2019)

RESUMO

No Planalto Norte Catarinense, a Floresta Nacional de Três Barras – Flona é uma reserva com remanescentes da *Araucaria angustifolia*, atualmente enquadrada na lista de espécies ameaçadas de extinção. Do pinhão, sua semente, o amido é o principal componente e a casca é considerada um resíduo. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades térmicas, de pasta, estruturais e morfológicas do amido da semente de *Araucaria angustifolia* na forma nativa, modificada por tratamentos químico e físico e após incorporação com extratos obtidos a partir da casca do pinhão. Os pinhões foram coletados após queda natural das pinhas nos talhões A, B e C da Flona. O amido de pinhão foi obtido por extração aquosa, cujo processo apresentou bom rendimento. O bagaço residual pode ser considerado fonte de fibras. A estabilidade térmica e temperaturas de gelatinização foram menores para o amido cuja semente foi coletada no talhão A, e a viscosidade de pico foi similar entre as três amostras. Após, os amidos de milho e de pinhão foram modificados com tripolifosfato de sódio em um processo de três etapas. Diferente do comportamento das demais amostras, quatro perdas de massa foram verificadas por termogravimetria nas etapas intermediárias deste tratamento. Os amidos fosfatados apresentaram redução na temperatura inicial e na entalpia de gelatinização, aumento das viscosidades de pico e final, *setback* e *breakdown*. Na sequência, os amidos nativos e fosfatados foram submetidos ao tratamento com moinho de bolas. A moagem reduziu o teor de fósforo, especialmente dos amidos nativos. De uma forma geral, as alterações de todas as propriedades foram mais intensas para os amidos fosfatados submetidos à moagem. Por fim, os amidos de milho e pinhão foram incorporados com dois extratos (etanólico e aquoso) obtidos a partir da casca de pinhão. Em relação às amostras nativas, a estabilidade térmica foi menor para as amostras incorporadas com extrato e maior para as amostras controle, as quais foram obtidas por tratamento somente com solvente. Em relação à gelatinização, poucas alterações foram observadas na temperatura, mas a incorporação reduziu a variação de entalpia de ambos os amidos. Em todos os resultados não foram observadas alterações nos padrões de difratometria de raios X, no entanto um aumento na cristalinidade relativa foi observado após fosfatação, enquanto o moinho de bolas causou redução. Somente a modificação física promoveu alterações na morfologia dos grânulos. Os resultados são fonte de relevantes informações sobre este amido não convencional. Contudo, sem esgotar as possibilidades de modificação visando aplicações específicas, o amido de pinhão apresentou características que o tornam interessante para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos. Proporcionar um uso mais nobre e sustentável do pinhão pode colaborar com a preservação da *Araucaria angustifolia*, cuja regeneração natural está em constante queda.

Palavras-chave: Amido não convencional. Fosfatação. Moinho de bolas. Análise térmica. Propriedades de pasta.

ABSTRACT

In the Northern Plateau of Santa Catarina Plateau, the Três Barras National Forest - Flona is a reserve with remnants of *Araucaria angustifolia*, nowadays included in the list of endangered species. From its seed, named pinhão, the starch is the main component and the coat is considered a residue. The aim of this work was to evaluate the thermal, paste, structural and morphological properties of *Araucaria angustifolia* seed starch in native form, modified by chemical and physical treatments and after incorporation with extracts obtained from the pinhão coat. The pinhão were collected after the natural fall of the pine cones in the A, B and C plots of Flona. Pinhão starch was obtained by aqueous extraction, which process showed good yield. Residual bagasse can be considered a source of fiber. The thermal stability and gelatinization temperatures were lower for the starch whose seed was collected in plot A, and the peak viscosity was similar between the three samples. Subsequently, corn and pinhão starches were modified with sodium tripolyphosphate in a three step process. Unlike the behavior of the other samples, four mass losses were verified by thermogravimetry in the intermediate stages of this treatment. Phosphate starches showed reduction in the initial temperature and gelatinization enthalpy; was observed an increase in peak and final viscosities, *setback* and *breakdown*. In sequence, native and phosphate starches were submitted to ball milling treatment. Grinding reduced the phosphorus content, mainly for native starches. In general, changes in all properties were more intense for phosphate starches after milling. Finally, corn and pinhão starches were incorporated with two extracts (ethanolic and aqueous) obtained from pinhão coats. In relation to the native starches, the thermal stability was lower for the samples incorporated with extract and higher for the control samples, which were produced under the same conditions, in contact with only solvents, without extracts. Regarding gelatinization, few changes were observed in temperature, but incorporation reduced the enthalpy of both starches. In all results no changes were observed in X-ray diffraction patterns, however the relative crystallinity increased after phosphating, while the ball milling treatment caused reduction. Only the physical modification promoted changes in granule morphology. The results are a source of relevant information about this unconventional starch. However, without exhausting the possibilities of starch modification for specific applications, pinhão starch showed properties that make it interesting for application in food and pharmaceutical products. Providing a more noble and sustainable use of pinhão can contribute to the conservation of *Araucaria angustifolia*, whose natural regeneration is constantly falling.

Keywords: Unconventional starch. Phosphating. Ball milling. Thermal analysis. Pasting Properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - <i>Araucaria angustifolia</i>	18
Figura 1.2 – Estrutura reprodutiva feminina (esquerda) e masculina (direita) de um ramo de <i>Araucaria angustifolia</i> monoica	22
Figura 1.3 - Estrutura da pinha	22
Figura 1.4 - <i>Araucaria angustifolia</i> enxertada (esquerda) e comum (direita).....	23
Figura 1.5 – Frações do pinhão	25
Figura 1.6 - Propostas de estrutura do amido reticulado com TPS	35
Figura 1.7 - Propostas de mecanismo de reação de fosfatação de amido com tripolifosfato de sódio em pH >10	35
Figura 1.8 - Propostas de mecanismo de reação de fosfatação de amido com tripolifosfato de sódio em pH < 9	36
Figura 1.9 – Curvas TG/DTG (a esquerda) e TG/DTA (a direita) típicas para amidos nativos	44
Figura 1.10 - Ilustração esquemática das temperaturas de transição To (temperatura inicial ou onset), Tp (temperatura de pico) e Tf (temperatura final).....	46
Figura 1.11 - Ilustração esquemática de viscoamilograma obtido por RVA.....	49
Figura 1.12 - Difrátogramas de raios X de amido de pinhão nativo segundo alguns autores	55
Figura 1.13 - Microimagens de amido de pinhão nativo obtido por diferentes metodologias	58
Figura 2.1 – Fluxograma da extração aquosa do amido de pinhão	65
Figura 2.2 – Distribuição de comprimento dos pinhões coletados na Flona.....	68
Figura 2.3 – Massa (%) de cada fração dos pinhões coletados na Flona	69
Figura 2.4 – Curvas TG/DTG dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona.....	72
Figura 2.5 – Curva DSC dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona	74
Figura 2.6 – Difrátogramas dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões da Flona.....	76
Figura 2.7 – Microimagens dos produtos resultantes do processamento do pinhão	77
Figura 3.1 - Etapas de fosfatação de amidos de milho e pinhão	83
Figura 3.2 - Curvas TG/DTG dos amidos de milho (esquerda) e de pinhão (direita), nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.....	87
Figura 3.3 - Curvas DSC de amidos de milho (esquerda) e de pinhão (direita), nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.	89
Figura 3.4 - Padrão de difração de raios X de amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.	92

Figura 3.5 - Microimagens (2000x) de amidos de milho (acima) e de pinhão (abaixo), nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.....	94
Figura 4.1 - Área total (AT) e Área do Pico (AP) marcadas no difratograma de DRX do amido para calcular a cristalinidade relativa (CR) das amostras	102
Figura 4.2 - Curvas TG/DTG dos amidos de milho (M, à esquerda) de pinhão (P, à direita): nativo (N), fosfatado (F), tratado com moinho de bolas (M) e duplamente modificado (F+M)	105
Figura 4.3 - Curvas DSC dos amidos de milho (M, à esquerda) de pinhão (P, à direita): nativo (N), fosfatado (F), tratado com moinho de bolas (M) e duplamente modificado (F+M).	107
Figura 4.4 - Padrões de difração de raios X dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados.....	109
Figura 4.5 - Espectros de FTIR dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados.	112
Figura 4.6- Microimagens dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados.	116
Figura 5.1 - Semente de <i>Araucaria angustifolia</i>	121
Figura 5.2 - Preparação dos extratos aquoso e etanólico da casca de pinhão e sua incorporação nos amidos de milho e pinhão	124
Figura 5.3 - Curvas TG/DTG dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão.....	127
Figura 5.4 - Curvas de gelatinização DSC dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão.....	130
Figura 5.5 - Curva DSC e imagens termomicroscópicas de 10-400 °C da amostra P-eOH, representativas das demais amostras.	132
Figura 5.6- Difratogramas de raios X dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão.....	133
Figura 5.7 - Microimagens dos amidos nativos de milho (MN) e pinhão (PM) e após incorporação com extratos etanólicos de cascas de pinhão (M-eOH e P-eOH)	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Composição proximal (g 100g ⁻¹) de pinhão cru e cozido, descascados, obtida por diferentes autores	26
Tabela 1.2 - Produtos derivados da <i>Araucaria angustifolia</i> e possibilidades de uso	29
Tabela 1.3 - Compostos fenólicos presentes nas diferentes frações do pinhão	31
Tabela 1.4 - Composição proximal (g 100g ⁻¹) do amido de pinhão de acordo com alguns autores	41
Tabela 1.5 - Resultados de DSC do amido de pinhão realizada em diferentes condições analíticas	47
Tabela 1.6 – Resultados de RVA de amido de pinhão e milho nativo obtidos por diferentes autores	51
Tabela 2.1 – Composição proximal (g 100g ⁻¹) da farinha de pinhão e do bagaço residual do processo de extração de amido	70
Tabela 2.2 – Resultados TG/DTG dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona	73
Tabela 2.3 – Temperatura e entalpia de gelatinização dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona	74
Tabela 2.4 – Resultados da viscoamilografia dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona	75
Tabela 3.1 - Teor de fósforo (P), grau de substituição (DS) e resultados de gelatinização por DSC dos amidos de milho e pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.	85
Tabela 3.2 - Resultados de TG/DTG para os amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.	88
Tabela 3.3 - Propriedades de pasta de amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS.....	91
Tabela 3.4 – Cristalinidade relativa (CR, %) de amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.	93
Tabela 4.1 - Teores de fósforo e sódio em amostras de amido analisadas por WDXRF, grau de substituição (DS) e alteração no teor de fósforo após moagem	103
Tabela 4.2 - Resultados TG/DTG dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados	106
Tabela 4.3 - Resultados DSC dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados	108
Tabela 4.4 - Cristalinidade relativa (CR) dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados.....	110
Tabela 4.5 - Bandas FTIR na região de impressão digital do amido (região II)	113
Tabela 5.1 - Resultados TG/DTG dos amido de milhos e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão.....	128
Tabela 5.2 - Resultados DSC e cristalinidade relativa dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão	131
Tabela 5.3 – Principais bandas observadas no FTIR dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão	134

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 1 - ASPECTOS BOTÂNICOS E HISTÓRICOS DA <i>Araucaria angustifolia</i> NO PLANALTO NORTE CATARINENSE COM FOCO NA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO.....	18
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA <i>Araucaria angustifolia</i> NO PLANALTO NORTE CATARINENSE	18
1.2 REGULAMENTAÇÃO DA COLETA DO PINHÃO.....	20
1.3 ASPECTOS BOTÂNICOS DA <i>Araucaria angustifolia</i> COM FOCO NA PRODUÇÃO DE PINHÃO E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE.....	21
1.4 COMPOSIÇÃO DO PINHÃO	25
1.5 AMIDO.....	32
1.5.1 Modificação química do amido por fosfatação	34
1.5.2 Modificação física do amido em moinho de bolas	37
1.6 AMIDO DE PINHÃO	38
1.6.1 Extração do amido de pinhão	38
1.6.2 Composição proximal do amido de pinhão	40
1.6.3 Propriedades térmicas do amido de pinhão	42
1.6.3.1 Termogravimetria	43
1.6.3.2 Calorimetria exploratória Diferencial.....	45
1.6.4 Propriedades de pasta do amido de pinhão.....	49
1.6.5 Retrogradação do amido de pinhão	52
1.6.6 Propriedades estruturais do amido de pinhão	54
1.6.6.1 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX).....	54
1.6.6.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	56
1.6.7 Propriedades morfológicas do amido de pinhão.....	58
CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO DE PINHÃO A PARTIR DE SEMENTES COLETADAS NA FLORESTA NACIONAL DE TRÊS BARRAS	60
2.1 INTRODUÇÃO.....	62
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.2.1 Coleta de amostras.....	63
2.2.2 Obtenção do amido de pinhão	64
2.2.3 Determinação do comprimento e massa dos pinhões.....	65
2.2.4 Cálculo do rendimento do processo de extração de amido	65
2.2.5 Composição proximal.....	66
2.2.6 Análise Termogravimétrica (TG/DTG).....	66
2.2.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	66
2.2.8 Propriedades de pasta (RVA)	66
2.2.9 Difractometria de raios X pelo método de pó (DRX)	66

2.2.10 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	67
2.2.11 Análise Estatística	67
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.3.1 Comprimento e massa dos pinhões	67
2.3.2 Rendimento do processo de extração de amido.....	69
2.3.3 Composição proximal da farinha e do bagaço.....	70
2.3.4 Análise Termogravimétrica (TG/DTG).....	72
2.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	73
2.3.6 Propriedades de pasta (RVA)	75
2.3.7 Difractometria de raios X pelo método de pó (DRX)	76
2.3.8 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	77
2.4 CONCLUSÃO.....	78
CAPÍTULO 3 - AMIDOS DE MILHO E PINHÃO MODIFICADOS COM TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO: PROPRIEDADES TÉRMICAS, DE PASTA, ESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS	79
3.1 INTRODUÇÃO.....	81
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
3.2.1 Fosfatação dos amidos.....	82
3.2.2 Determinação do conteúdo de fósforo e grau de substituição	83
3.2.3 Termogravimetria (TG)	83
3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	84
3.2.5 Propriedades de pasta	84
3.2.6 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)	84
3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	84
3.2.8 Análise Estatística	85
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.3.1 Teores de fósforo e sódio e grau de substituição.....	85
3.3.2 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG)	86
3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	89
3.3.4 Propriedades de pasta	91
3.3.5 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)	92
3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	94
3.4 CONCLUSÃO.....	95
CAPÍTULO 4 - EFEITO DO MOINHO DE BOLAS NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, ESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS DE AMIDOS FOSFATADOS DE MILHO E PINHÃO	96
4.1 INTRODUÇÃO.....	98
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
4.2.1 Obtenção do amido.....	99
4.2.2 Fosfatação dos amidos.....	99
4.2.3 Moinho de Bolas.....	99
4.2.4 Teores de fósforo e sódio por análise de espectroscopia por dispersão de raios X por comprimento de onda (WDXRF).....	99

4.2.5 Determinação do Grau de Substituição e Alteração no Conteúdo de Fósforo após o tratamento com moinho de Bolas.....	100
4.2.6 Alteração no Conteúdo de Fósforo após o tratamento com moinho de bolas	100
4.2.7 Termogravimetria (TG)	100
4.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	101
4.2.9 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)	101
4.2.10 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	102
4.2.11 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	102
4.2.12 Análise Estatística	102
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.3.1 Teores de fósforo e sódio por WDXRF e grau de substituição	103
4.3.2 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG)	104
4.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	107
4.3.4 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)	109
4.3.5 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	111
4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	116
4.4 CONCLUSÃO.....	117
CAPÍTULO 5 - EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DA CASCA DE PINHÃO NAS PROPRIEDADES DOS AMIDOS DE MILHO E PINHÃO.....	119
5.1 INTRODUÇÃO.....	121
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	123
5.2.1 Separação das cascas e do amido das sementes de pinhão	123
5.2.2 Preparo de extratos aquoso e etanólico das cascas de pinhão	123
5.2.3 Incorporação dos extratos em amidos de pinhão e milho.....	123
5.2.4 Termogravimetria (TG)	124
5.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	125
5.2.6 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)	125
5.2.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	125
5.2.8 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	126
5.2.9 Análise Estatística	126
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
5.3.1 Termogravimetria (TG)	126
5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	129
5.3.3 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)	132
5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	134
5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	135
5.4 CONCLUSÃO.....	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	138
REFERÊNCIAS	140
ANEXOS	154

INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze é uma árvore nativa da região Sul do Brasil e, devido a sua extensa exploração madeireira, encontra-se na lista das espécies ameaçadas de extinção. Para preservação da mata remanescente das araucárias, no Planalto Norte Catarinense encontra-se a Floresta Nacional de Três Barras (Flona), uma unidade de conservação ligada ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio.

Entre os recursos não-madeiráveis da araucária encontra-se a sua semente, o pinhão. Apesar de ser sazonal e perecível, a semente serve como alimento para animais de diversas espécies, e apresenta características nutricionalmente importantes para os humanos. Além disso, a coleta do pinhão está aliada a questões históricas, culturais, sociais e, se realizada de forma consciente, contribui com a preservação da araucária.

O pinhão apresenta um alto teor de amido que pode ser facilmente extraído. Sua casca é considerada um resíduo do processo de obtenção do amido, embora apresente compostos que podem ser extraídos e aplicados em outras matrizes alimentícias.

Modificações químicas e físicas são comumente realizadas em amidos com a intenção de promover propriedades diferentes daquelas observados nos amidos nativos, ampliando sua gama de aplicação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar o amido de pinhão coletado na Flona, e avaliar os efeitos das modificações química e física e da incorporação dos extratos obtidos da sua casca em possíveis aplicações industriais.

Este documento apresenta-se em forma de capítulos. O primeiro traz dados históricos do Planalto Norte Catarinense e informações botânicas da araucária com foco na obtenção de pinhão. Além disso, apresenta algumas metodologias aplicadas para avaliação das propriedades do amido, explanando resultados encontrados por demais pesquisadores. No capítulo 2 estão apresentados os resultados de caracterização do amido de pinhão coletados na Flona de Três Barras. No capítulo 3, os amidos de milho e pinhão foram modificados quimicamente com tripolifosfato de sódio, e suas propriedades térmicas, de pastas, estruturais e morfológicas foram avaliadas. O capítulo 4 é uma continuação do anterior, no qual foram estudadas as propriedades dos amidos fosfatados submetidos ao tratamento físico com moinho de bolas. Por fim, no capítulo 5, a partir da casca de pinhão foram obtidos dois extratos, aquoso e etanólico, e ambos foram incorporados aos amidos de milho e pinhão cujas propriedades foram avaliadas.

Destes capítulos, o terceiro e o quarto são artigos publicados na revista *Starch/Stärke*. O quinto capítulo foi publicado no *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. As primeiras páginas de cada artigo e as respectivas licenças dos Direitos Autorais encontram-se em anexo.

Os esforços deste trabalho concentraram-se no estudo das propriedades do amido de pinhão submetidos a diferentes tratamentos. Agrupando os principais resultados nas considerações finais deste trabalho, buscou-se demonstrar que o amido da semente da *Araucaria angustifolia* pode ser empregado para diversos fins, gerando valor agregado ao produto.

Evidenciando estratégias para o uso sustentável do pinhão, pretende-se contribuir com a preservação da espécie, aliada aos aspectos históricos, culturais e sociais inerentes à sua coleta e consumo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar as propriedades do amido de pinhão submetido aos tratamentos químico, físico e de incorporação de extratos visando possíveis aplicações industriais

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apresentar os principais aspectos relacionados à *Araucaria angustifolia* com foco na obtenção de amido;
- Revisar dados da literatura científica sobre as principais propriedades do amido de pinhão;
- Empregar técnicas termoanalíticas, estruturais, viscoamilográficas e morfológicas para caracterizar o amido de pinhão coletado na Floresta Nacional de Três Barras;
- Avaliar as propriedades do amido de pinhão submetido a fosfatação por tripolifosfato de sódio;
- Analisar o efeito do tratamento com moinho de bolas nas propriedades do amido de pinhão fosfatado;
- Verificar as propriedades de amido de pinhão após incorporação com os extratos aquoso e etanólico obtidos a partir da casca do pinhão.

CAPÍTULO 1 - ASPECTOS BOTÂNICOS E HISTÓRICOS DA *Araucaria angustifolia* NO PLANALTO NORTE CATARINENSE COM FOCO NA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* NO PLANALTO NORTE CATARINENSE

O surgimento família Araucariaceae remonta a Era Paleozoica, há cerca de 350 milhões de anos. Atualmente, o Hemisfério Sul (Oceania e América do Sul) concentra os três gêneros da família (ZANETTE *et al.*, 2017). De um total de 23 espécies, a *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze (Figura 1.1) é a única com ocorrência natural no Brasil (SHIBATA *et al.*, 2016). De acordo com pesquisas de fósseis no solo, sua ocupação no Sul do país ocorreu há menos de 1500 anos (ZANETTE *et al.*, 2017).

Figura 1.1 - *Araucaria angustifolia*



Fonte: Arquivos da Floresta Nacional de Três Barras (Flona).

A árvore da espécie *Araucaria angustifolia* é conhecida popularmente como pinheiro do Paraná, araucária, pinho, pinheiro brasileiro, dentre outros nomes. É considerada a principal espécie da Floresta Ombrófila Mista (FOM), um ecossistema do Bioma Mata Atlântica (SHIBATA *et al.*, 2016).

Historicamente, a araucária já constituiu o principal item da economia florestal do país devido a qualidade de sua madeira para construções e do alto teor de celulose para fabricação de papel (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012; SHIBATA *et al.*, 2016).

Em Santa Catarina, até o início do século XX, a Floresta Ombrófila Mista cobria 31 % (56.693 Km²) da área do Estado (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012). A região do Planalto Norte Catarinense possuía pinhais desenvolvidos e de aspecto fisionômico uniforme, com árvores cujo porte atualmente é raro na região (ZECHINI, 2012).

Durante 70 anos, a Região do Contestado foi cenário de um fenômeno econômico que marcou a História de Santa Catarina como um dos mais importantes do século XX: a produção de madeira a partir da exploração do pinheiro (*Araucaria angustifolia*) e, em menor escala da imbuia (*Ocotea porosa*). Na época, houve a instalação de uma grande serraria no município de Três Barras, a qual serrava mais de 400 m³ de madeira por dia (FERREIRA, 2008; ZECHINI, 2012). A exploração da floresta de Araucária foi predatória, tanto do ponto de vista ecológico, quanto econômico e social (SANT'ANNA, 2011).

Em função do crescente desmatamento já identificado na época, nas décadas de 40 e 50 foram criadas as Florestas Nacionais (Flonas) da região sul do Brasil. As Flonas são áreas com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e que tem como objetivo o uso sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012; FERREIRA, 2008)

Localizada no Planalto Norte de Santa Catarina, a Floresta Nacional de Três Barras possui 4.458,50 ha, sendo que a área de reflorestamento e de floresta nativa com araucária representam 14,2 % e 17,2 % do total, respectivamente. As demais frações compreendem floresta ciliar, campos de várzea (banhado), plantios de pinus, experimentos, lagoas e tanques, e área não florestal (GONÇALVES *et al.*, 2016).

A Floresta Nacional de Três Barras foi criada com o objetivo desenvolver estratégias para o uso múltiplo sustentável das florestas com araucária e compatibilizar a conservação da mata nativa com atividades economicamente produtivas e de subsistência das famílias da região, bem como fomentar o desenvolvimento da pesquisa e da educação ambiental (ZECHINI, 2012).

A unidade apresenta grande relevância para estudos, na sua maioria voltados à área de conhecimento de Recursos Genéticos Vegetais (FERREIRA, 2008; SANT'ANNA, 2011; SHIBATA, 2013; ZECHINI, 2012) pois, além da premissa de conservação da espécie nativa, na década de 50 foram implantados diversos talhões da semente de araucária, procedentes de diferentes locais, como: Anita Garibaldi (RS), Curitiba (SC) e Canoinhas (SC). O conjunto de populações (nativa e plantada) presente na Flona representa uma das maiores diversidades genéticas da espécie em unidades de conservação no Brasil que, provavelmente, não existem em populações naturais (FERREIRA, 2008).

A descontrolada extração da madeira entre os anos 1910 e 1970 destruiu 97 % do habitat da araucária. Atualmente, entre as 1090 espécies de gimnospermas do planeta, a Araucária está em terceiro lugar entre as mais ameaçadas de extinção do programa de Espécies de Evolução Distinta e Globalmente Ameaçadas (EDGE, na sigla em inglês) (WILSON *et al.*, 2019). Também é citada nas listas da União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e do Ministério do Meio Ambiente (SANT'ANNA, 2011).

Em 2001, uma legislação do Conselho Nacional do Meio Ambiente impediu a exploração da madeira de araucárias nativas. No entanto, tal legislação desvalorizou economicamente a espécie com consequente perda de interesse na conservação, estimulando proprietários rurais a impedir a regeneração natural da araucária (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012).

Além disso, há uma preocupação quanto a sobrevivência das araucárias em relação à mudança climática antropogênica do século XXI. Segundo projeções matemáticas realizadas por Wilson *et al.* (2019), com o contínuo aumento de temperatura associado às alterações do regime de chuvas, até 2070 poderá haver uma redução de 96,5 % da floresta no Sul do Brasil onde a probabilidade de ocorrência da araucária seja maior que 75 %.

Apesar da baixa regeneração florestal e da alta probabilidade de redução das árvores existentes, a extração ilegal de madeira de araucária nativa ainda continua (WILSON *et al.*, 2019). Todas essas práticas colaboram com a redução do que é considerado uma importante atividade do ponto de vista social, econômico e cultural para as famílias da região: a coleta das sementes da araucária, o pinhão (GONÇALVES *et al.*, 2016).

1.2 REGULAMENTAÇÃO DA COLETA DO PINHÃO

Dados oficiais sobre a comercialização do pinhão apontam que em 2018 foram colhidas 9462 toneladas de pinhão, movimentando mais de 24,7 milhões de reais (IBGE, 2018). Assim, o pinhão é considerado um recurso alimentício e econômico para as comunidades coletoras do Sul do Brasil, composta principalmente por agricultores familiares e pessoas de baixa renda (ZECHINI *et al.*, 2012).

Com a prática da coleta e comercialização do pinhão, estas famílias contribuem para a conservação da Floresta Ombrófila Mista uma vez que empregam conhecimento tradicional ao manejo da semente, e possuem em suas propriedades uma significativa área ocupada por estes remanescentes (ZECHINI *et al.*, 2012).

Como forma de contribuir com a cadeia produtiva do pinhão e garantir a reprodução da araucária, o Estado de Santa Catarina, através da Lei nº 15.457 de 17 de janeiro de 2011, regulamenta que a colheita, transporte e comercialização de pinhão pode ser iniciada somente a partir do dia primeiro de abril.

A Floresta Nacional de Três Barras, através de instrução normativa interna, restringe a coleta de pinhão na sua unidade às sementes disponíveis no solo devido à queda natural das pinhas, como forma aliar a conservação e educação ambiental com o alcance social desta prática. As áreas para a atividade são demarcadas e a quantidade máxima a ser coletada por pessoa por dia é de 10 Kg. Essa quantia pode ser maior em caso de situação de carência e desemprego comprovadas. A instrução também alerta aos cuidados com as plantas jovens e com a regeneração natural (GONÇALVES *et al.*, 2016).

No entanto, para fins de atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior, é possível coletar material em períodos e quantidades diferenciadas daquelas estabelecidas pelas normas supracitadas. Para isso, é necessário requerer autorização para coleta de material biológico da Flona de Três Barras, seguindo a Instrução Normativa nº 03 de 2014 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O requerimento é realizado pela submissão de um projeto e preenchimento de dados no sistema Sisbio. A coleta do material pode ser iniciada somente após análise e aprovação do projeto, que é renovado anualmente dentro do período requerido.

1.3 ASPECTOS BOTÂNICOS DA *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* COM FOCO NA PRODUÇÃO DE PINHÃO E CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE

A *Araucaria angustifolia* é uma planta dióica com árvores masculinas e femininas distintas, reproduzindo-se por polinização cruzada. É raramente monóica por traumas, doenças ou outros motivos ainda não bem elucidados (ZANETTE *et al.*, 2017). A estrutura reprodutiva masculina, produtora do pólen, apresenta-se em forma cilíndrica, com 10-15 cm de comprimento e fica localizada em ramos jovens (Figura 1.2). A pinha, nome dado à estrutura reprodutiva feminina, fica localizada no ápice dos ramos. Quando maduras têm entre 10 e 20 cm de diâmetro e apresentam-se em formato subarredondado (SHIBATA, 2013).

A polinização natural ocorre entre setembro e outubro, e as pinhas amadurecem em 2 a 3 anos (BRANCO; RODRIGUES, 2016). Cada árvore produz anualmente cerca de 40 pinhas, chegando a atingir até 200 pinhas por planta (SHIBATA, 2013). A polinização controlada é uma importante ferramenta para melhoramento genético das araucárias, pois contribui para o aumento do número de pinhas por árvore e produtividade de pinhão (ZANETTE *et al.*, 2017).

Figura 1.2 – Estrutura reprodutiva feminina (esquerda) e masculina (direita) de um ramo de *Araucaria angustifolia* monoica



Fonte: ZANETTE *et al.* (2017)

Quando o óvulo é fecundado, desenvolve-se a semente da *A. angustifolia*, denominada pinhão. A maturação da pinha caracteriza-se pelo término do seu desenvolvimento, e ocorre em diferentes épocas, dependendo da variedade e do local (SHIBATA, 2013).

Cada pinha madura possui quatro estruturas (Figura 1.3): um eixo central, pinhões cheios (que foram fecundados), pinhões chochos (não fecundados) e as falhas ou brácteas (escamas estéreis). Geralmente obtém-se de 2 a 150 sementes por pinha (ZANETTE *et al.*, 2017), o que pode representar aproximadamente 1/3 da sua massa (PERALTA *et al.*, 2016).

Figura 1.3 - Estrutura da pinha



Fonte: Autoria própria

Nota: (a) eixo central; (b) pinhão cheio; (c) pinhão chocho e (d) brácteas

Embora a araucária tenha uma vida produtiva longa, entre 200 e 300 anos, o início da produção de pinhões é considerada demorada (ZANETTE *et al.*, 2017). Quando plantadas, araucárias isoladas iniciam a produção entre 12 e 15 anos. Em povoamentos, a produção dá-se a partir de 20 anos em árvores com pelo menos 8 m de altura, praticamente inviabilizando o plantio de araucária para coleta e comercialização de pinhão (AMARANTE *et al.*, 2007).

No entanto, há falta de interesse em plantios de araucária para fins madeireiros, tornando o fomento do seu plantio mais adequado para o aproveitamento econômico do pinhão (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012). Aliado a isso, o uso de técnicas corretas de manejo e coleta pode aumentar a produção de pinhões, contribuindo para diminuir a exploração sobre as araucárias remanescentes, mantendo sua biodiversidade e tornando seu cultivo rentável e competitivo.

Pesquisas recentes apontam avanços significativos neste aspecto. Uma metodologia de enxertia de brotos extraídos da copa de araucárias adultas foi desenvolvida pela Embrapa Florestas (PR). Os resultados demonstram que as árvores começam a produzir a partir entre 6 a 10 anos com o porte entre 2 e 3 m de altura, facilitando a coleta das sementes (Figura 1.4) (ZANETTE *et al.*, 2017).

Figura 1.4 - *Araucaria angustifolia* enxertada (esquerda) e comum (direita).



Fonte: Zanette (2014)

A técnica de enxertia possibilita o desenvolvimento de pomares de araucária com proporção ideal entre plantas machos (20 %) e fêmeas (80 %), a partir da seleção de materiais genéticos de matrizes com características mais atrativas ao consumidor. Além do aumento do potencial produtivo, percebe-se a vocação ornamental para as araucárias enxertadas (AMARANTE *et al.*, 2007; DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012; SANTOS *et al.*, 2002).

O momento ideal para colheita do pinhão é quando a pinha se encontra madura e presa na árvore, ou então recentemente caída no chão por ação da gravidade (ZANETTE *et al.*, 2017). Sementes imaturas e com alto teor de umidade deterioram-se rapidamente (SHIBATA; COELHO, 2016). Além disso, o acúmulo de nutrientes ocorre durante a desidratação das sementes nos estágios finais do amadurecimento, quando o teor de proteínas aumenta (PERALTA *et al.*, 2016).

Embora parte dos consumidores desconheça as propriedades nutricionais do pinhão (GODOY *et al.*, 2018), a semente é consumida crua, assada, cozida em água (BOLZAN *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2013) ou é utilizada como farinha para elaboração de pães e pratos regionais (CORDENUNSI *et al.*, 2004). É também apreciada pela fauna silvestre, em especial roedores, pequenos macacos e pássaros (JORGE *et al.*, 2018).

A composição química do pinhão, especialmente o alto teor de umidade que favorece sua perecibilidade (BRANCO; RODRIGUES, 2016; CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2011), e a sazonalidade de produção restringem a comercialização do pinhão *in natura* aos meses de março a agosto, na região de produção e em festas típicas do Sul do país (GODOY *et al.*, 2018).

Portanto, associado às propostas que visam o aumento da produtividade das árvores, torna-se necessário o desenvolvimento e aplicação de técnicas de conservação e de industrialização das sementes.

A fim de preservar a qualidade do pinhão *in natura* para consumo humano ou para processamento industrial, Amarante *et al.* (2007) avaliaram o efeito das diferentes temperaturas (de 0 a 50 °C) de armazenamento na conservação pós-colheita da semente. Após 24 h de armazenamento, verificaram que a máxima taxa respiratória do pinhão ocorreu a 37,1 °C. E as menores taxas ao longo de 50 dias de armazenamento ocorreram a temperaturas menores que 10 °C, sendo recomendado o armazenamento imediato a temperaturas próximas a 0 °C, com alta umidade relativa (90 ± 2 %). A baixa produção de etileno demonstrou que esse hormônio, responsável pela maturação e senescência de plantas, não apresenta influência na conservação do pinhão *in natura*.

Cladera-Oliveira (2008) verificou que o armazenamento sob refrigeração (5 °C) aumentou a vida de prateleira do pinhão de 5 dias (a temperatura ambiente) para 3 meses. Em até 8 meses de congelamento (-18 °C), não houve germinação ou desenvolvimento de fungos nos pinhões, fatores limitantes para sua vida de prateleira. Além disso, a autora propôs realizar operações preliminares de limpeza da semente com fluxo de ar forçado e peneiras, seleção manual e sanitização com água clorada (200 ppm), seguida de secagem superficial da casca com fluxo de ar quente (50 °C / 40 min) ou a temperatura ambiente por 24 horas.

Para reduzir a sua contaminação das cascas para uso imediato do pinhão, Conforti e Lupano (2007) realizaram a lavagem das sementes com solução NaClO 5 % e secagem com auxílio de papel absorvente.

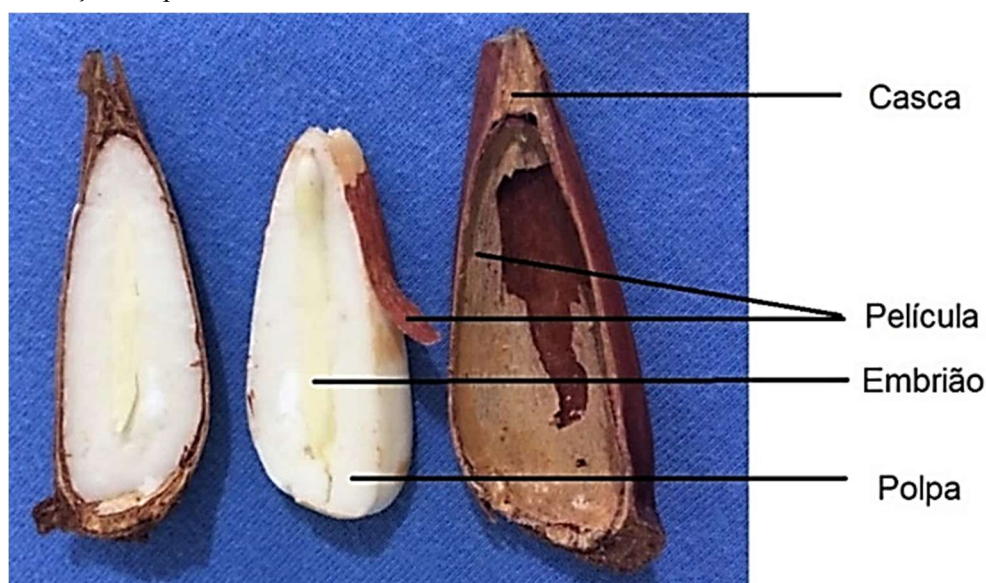
O aumento da vida de prateleira do pinhão *in natura*, a maior divulgação de suas propriedades nutricionais e a produção de derivados podem favorecer a sua comercialização além da época de colheita, ampliar o acesso a mercados consumidores fora da área de ocorrência

da Floresta com Araucária, além de aumentar o seu valor agregado e a renda das famílias envolvidas nesse processo (AMARANTE *et al.*, 2007; DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012; GODOY *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2002).

1.4 COMPOSIÇÃO DO PINHÃO

O pinhão é formado por quatro partes: a) casca (envoltório) , b) subcasca ou película interna, c) endosperma, polpa ou amêndoa, e d) embrião.

Figura 1.5 – Frações do pinhão



Fonte: Autoria própria

Cada pinhão tem entre 3 e 8 cm de comprimento, 2 a 9 cm de largura e pesa entre 7 a 9 g (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CORDENUNSI *et al.*, 2004). A polpa, que é a parte comestível da semente, representa cerca de 80 % da sua massa e possui em torno de 40-50 % de umidade e interessantes propriedades nutricionais (Tabela 1.1).

Os carboidratos são o principal componente do pinhão, dos quais destaca-se amido que representa aproximadamente 35 % de sua massa (Tabela 1.1). O conteúdo de açúcar total (7,1 %) e açúcar redutor (0,6 %) foi reportado por Henríquez *et al.* (2008). A semente crua contém cerca de 2,4 % de carboidratos solúveis. O cozimento em água, principal técnica de preparo para o consumo do pinhão, reduz o teor de glicose na semente para apenas 25 % do valor inicial (cru), enquanto a sacarose e a frutose têm uma redução de 45 % (CORDENUNSI *et al.*, 2004).

Tabela 1.1 - Composição proximal (g 100g⁻¹) de pinhão cru e cozido, descascados, obtida por diferentes autores

Autor	Amostra	Umidade	Proteína	Lípido	Carboidrato	Amido	Fibra	Cinzas
[1]	Cru	38,10	5,00	1,80	nd	33,33	nd	nd
[2]	Cru	49,50	3,57	1,26	44,07	36,28	4,89	1,60
	Cozido	50,35	3,31	1,26	43,67	34,48	5,72	1,41
[3]	Cru*	51,16	6,59	7,38	67,84	nd	15,34	2,85
	Cozido *	49,70	6,31	6,27	66,96	nd	16,88	3,57
[4]	Cru	43,70	3,42	1,67	48,42	nd	1,29	1,50
[5]	Cozido	50,5	3,0	0,7	43,9	-	15,6	1,8
[6]	Cru*	-	6,36	0,97	nd	63,75	5,20	2,51

nd = não determinado; * = resultados em base seca

Fonte: Adaptado de: [1] Wosiacki; Cereda (1985) ; [2] Cordenunsi *et al.* (2004); [3] Capella; Penteadó; Balbi, (2009); [4] Silva *et al.* (2016); [5] Nepa – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (2011); [6] Jorge *et al.* (2018)

O pinhão é considerado também como uma boa fonte de fibra alimentar total. Cordenunsi *et al.* (2004) verificaram que o conteúdo de fibra insolúvel (4,16 % da massa do pinhão) é quase sete vezes maior que o de fibra solúvel, sendo maior após cozimento. O alto teor de fibras pode dificultar o inchamento e a completa gelatinização dos grânulos de amido durante o cozimento, o que pode contribuir para a formação de amido resistente após resfriamento do pinhão. Este fato também pode colaborar para o seu baixo índice glicêmico, que é aproximadamente 23 % do valor obtido para o pão branco (CORDENUNSI *et al.*, 2004).

O teor de proteínas na polpa também é considerado baixo, variando entre 3 e 5 %. No entanto, elas apresentam valor biológico comparável às sementes de leguminosa, contendo lisina e histidina como aminoácidos limitantes (BRANCO; RODRIGUES, 2016). Conforti e Lupano (2011) reportaram que os teores de leucina, lisina e valina na proteína da farinha de pinhão são maiores que na proteína de soja, sendo o triptofano atribuído como aminoácido limitante. Ambas as proteínas apresentaram menores teores destes aminoácidos essenciais quando comparadas à caseína. Leite *et al.* (2008), em estudos com ratos em crescimento, consideraram a farinha de pinhão como uma fonte complementar de proteína, podendo substituir até 20 % de uma proteína de alto valor biológico em formulações alimentares.

Embora o teor de lipídeos do pinhão seja considerado baixo (CORDENUNSI *et al.*, 2004; HENRÍQUEZ *et al.*, 2008), Silva *et al.* (2016) verificaram a presença de compostos bioativos na fração. De acordo com os autores, a extração subcrítica proporcionou rendimento semelhante ao obtido por extração a quente com solvente (Soxhlet), mas em um menor tempo. Treze ácidos graxos foram identificados no óleo de pinhão. O óleo obtido por esta metodologia apresentou maiores níveis de ácidos graxos saturados, enquanto a extração subcrítica proporcionou maior concentração de ácidos graxos das séries ômega-6 e ômega-3, tocoferol

total, fitoesterol total e maior estabilidade oxidativa. A condição otimizada de extração com uso de *n*-propano para obter maiores concentrações destes compostos bioativos foi a 40 °C e 8 MPa.

Em relação aos minerais, o consumo da semente contribui com a nutrição humana, pois pode ser considerada fonte dos seguintes micronutrientes: K, P, Mn, Cu, Mo e Cr. Outros elementos encontrados, mas em menor proporção, foram Ca, Mg, Fe e Zn (BARBOSA *et al.*, 2019). No entanto, Cordenunsi *et al.* (2004) reportaram a semente como sendo fonte de Mg e Cu por conter mais de 15 % da recomendação mineral para adultos. Verificaram também que a presença da casca durante o cozimento interfere na quantidade de minerais do pinhão. Quando cozido com a casca, os teores de Mg, Fe, Zn, Cu e P foram menores que no pinhão cru, sendo reduzido significativamente apenas para este último. Quando cozido sem a casca, houve redução dos mesmos minerais, sendo significativa para P, Cu e Mg. Dos minerais avaliados, o cálcio foi o único que teve seu teor aumentado após cozimento, independente da presença da casca.

A composição do pinhão varia de acordo com sua genética, estágio de desenvolvimento ou maturação, temperatura e técnicas de irrigação, entre outros (HENRÍQUEZ *et al.*, 2008; PERALTA *et al.*, 2016).

Assim, além do descrito sobre a qualidade nutricional e sobre a busca por melhores condições de armazenamento da semente *in natura*, o estudo e desenvolvimento de produtos derivados do pinhão pode contribuir para ampliar sua conservação e industrialização, com consequente e desejável aumento no seu consumo.

O pinhão apresenta grande potencial para a alimentação humana. A Embrapa Florestas publicou um livro com mais de 100 receitas da gastronomia moderna, destacando os seus aspectos nutricionais para elaboração de pratos doces e salgados (GODOY *et al.*, 2013).

Além do uso culinário, o pinhão é utilizado para produção de farinha. Ela é obtida a partir do descascamento, remoção da película interna, secagem da amêndoa em estufa, moagem e peneiramento (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2011).

A farinha também pode ser obtida a partir das sementes previamente cozidas, sendo ambas uma interessante fonte nutricional e uma opção para o seu processamento tecnológico (CAPELLA; PENTEADO; BALBI, 2009). Cladera-Olivera (2008) verificou que a mistura em pó pronta para o preparo de suflê, desenvolvida a partir da farinha de pinhão cozido, apresentou maior aceitação que aquela produzida com a semente crua.

Estudos de modelos de sorção de umidade foram realizados com as farinhas de pinhão cru e cozidas para otimizar as suas condições de armazenamento. O cozimento e a temperatura

de secagem influenciaram os resultados físico-químicos e sensoriais da farinha (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2011).

Além de servir como fonte para extração de amido (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014; HENRÍQUEZ *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2014), a farinha de pinhão pode ser aplicada para produção de produtos panificados tais como broas, tortas, pães e biscoitos (ACORSI *et al.*, 2009). Em conjunto com o amido de batata, ou com este e farinha de arroz, a farinha de pinhão apresentou potencial para desenvolvimento de pães sem glúten, ideal para portadores de doença celíaca (POLET *et al.*, 2019).

Devido ao seu baixo teor de proteínas, fibras, cinzas e lipídeos e alto conteúdo de amido, a farinha de pinhão pré-gelatinizada pode substituir em até 20 % o malte para produção de cerveja. A substituição contribuiu com os aspectos sensoriais e aumentou o rendimento em 10 %, o que a torna economicamente viável (JORGE *et al.*, 2018).

Outras frações do pinhão também têm sido alvo de pesquisas visando colaborar com o aumento do consumo e valorização da semente, com intenção de cooperar com a conservação da espécie e tornar uma alternativa econômica para os residentes dos locais de coleta.

Daudt *et al.* (2016) desenvolveram filmes comestíveis a partir de farinha e de amido de pinhão. Após incorporação de um pó obtido da casca de pinhão (DAUDT *et al.*, 2017), foi observado um aumento da permeabilidade ao vapor d'água. No entanto, a maior hidrofilicidade não impede sua aplicação uma vez que o uso da casca aumentou a resistência, o teor de fibras e de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos filmes. Estes resultados demonstraram a possibilidade de usar a semente toda, reduzindo desperdícios e etapas de processamento e fornecendo novas alternativas para o uso do pinhão (DAUDT *et al.*, 2017).

Além dos aspectos nutricionais que envolvem o consumo do pinhão *in natura* ou na forma de farinha, diferentes partes da araucária (folhas, casca da árvore, brácteas e casca do pinhão) são usadas com finalidade terapêutica (Tabela 1.2). Elas apresentam vários compostos químicos bioativos com potencial uso em indústrias farmacêuticas e cosméticas (PERALTA *et al.*, 2016).

Do processamento do pinhão, a casca é o principal coproduto. A casca é altamente resistente e removível da polpa, enquanto a subcasca é fina e fica firmemente aderida a ela. Ambas apresentam coloração que varia entre amarelo e vermelho escuro e são removidas após o cozimento (PERALTA *et al.*, 2016).

Tabela 1.2 - Produtos derivados da *Araucaria angustifolia* e possibilidades de uso

Fração	Produto	Possibilidades de uso
Casca da árvore	Infusão ⁽¹⁾	Uso tópico - tensões musculares e varizes
	Xarope (a partir da resina) ⁽¹⁾	Via oral - tratamento de infecções respiratórias
	Flavonóides	Forte atividade antioxidante;
	Extrato obtido em meio aquoso	Atividade antitumoral
Folhas	Infusão ⁽¹⁾	Emoliente, antisséptico, contra infecções respiratórias, reumatismo, fadiga e anemia
	Corante ⁽¹⁾	Tratamento de feridas e erupções herpéticas
	Biflavonóides	Atuam na proteção do DNA contra danos induzidos pela radiação ultravioleta (mais eficientes para radiações UV-B que UV-A) e na inibição da peroxidação lipídica; possibilidade de uso como antioxidante e protetor solar.
	Proantocianidinas	Em conjunto com os biflavonóides, são possivelmente os compostos que apresentaram maior atuação na atividade contra o vírus <i>Herpes Simplex</i> (HSV-1)
	Extrato obtido em acetona	Ação antibacteriana, mas sem efeito antifúngico
Nó	Tintura ⁽¹⁾	Via oral ou tópico – tratamento de reumatismo
	Infusão ⁽¹⁾	Via oral doenças renais e doenças sexualmente transmissíveis
Própolis	Extrato etanólico	Efeito citotóxico
	Extrato etanol/água	Atividades antiproliferativas, antitubulogênicas e antiangiogênicas
Amêndoa	Lectinas	Atividade aglutinadora contra eritrócitos de coelho; atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e positivas; atividade depressora no sistema nervoso central em ratos; atividades anti-inflamatórias e hemaglutinantes
Casca do pinhão	Taninos	Inibição da lipase pancreática e da α -amilase, com potencial uso para promover a perda de peso e combater a obesidade e suprimir a hiperglicemia pós-prandial em pacientes diabéticos; alto poder antioxidante com potencial uso como cosmético
	Flavonóides	Potencial antioxidante

Fonte: Adaptado de: Peralta *et al.* (2016) e Branco e Rodrigues (2016)

Nota: (1) Usos da medicina popular

Somada à película interna (subcasca), a casca representa cerca de 22 % a 35 % da massa total do pinhão (CORDENUNSI *et al.*, 2004; WOSIACKI; CEREDA, 1985). Apesar das suas inúmeras e interessantes propriedades (Tabela 1.2), estima-se que cerca de 10 toneladas de casca são descartadas anualmente (PERALTA *et al.*, 2016). Dessa forma, é importante desenvolver pesquisas que visem ampliar a gama de aplicação de derivados da casca, uma vez que não compromete a população remanescente de araucária e nem a alimentação humana e animal (BRANCO; RODRIGUES, 2016).

A casca e a subcasca do pinhão são ricas em compostos fenólicos (CORDENUNSI *et al.*, 2004) sendo considerados antioxidantes naturais importantes para a saúde humana pois atuam na inibição de mecanismos oxidativos associados a doenças cardiovasculares, degenerativas e câncer (KOEHNLEIN *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos são agrupados em diferentes classes, e não há um sistema reativo capaz de isolar simultaneamente todas essas classes (KOEHNLEIN *et al.*, 2012). O grau de polimerização destes compostos e sua interação com outros constituintes dos alimentos, bem como a polaridade do solvente utilizado, são fatores que interferem na seletividade das classes dos compostos resultantes de um processo de extração (ANGELO; JORGE, 2007). Além disso, a proporção casca:solvente, a concentração do solvente ou da combinação destes, a temperatura e tempo de reação resultam na obtenção de diferentes concentrações de cada um dos compostos, e interferem no rendimento do processo (SANTOS *et al.*, 2018). O custo dos reagentes bem como a segurança em relação ao seu uso são considerados durante a escolha do sistema de extração (KOEHNLEIN *et al.*, 2012).

Durante o cozimento, os compostos fenólicos migram da casca para a amêndoa e para a água. Como consequência, o teor destes na amêndoa cozida é até cinco vezes maior que na semente crua (CORDENUNSI *et al.*, 2004). Koehnlein *et al.* (2012) também reportaram aumento significativo de vários compostos após o cozimento do pinhão com casca.

Freitas *et al.* (2018) identificaram treze compostos fenólicos na água de cozimento do pinhão, bem como no extrato da casca obtido por dois meios distintos. Destes compostos, dez são proantocianidinas (derivados de catequina e epicatequina), dois ácidos fenólicos (derivados de ácido protocatecuico e ferúlico), um flavonol (quercetina-3-*O*-glucosídeo) e um flavanona (eriodictiol-*O*-hexosídeo).

Alguns processos de extração destes compostos na casca, subcasca e amêndoa do pinhão em diversos solventes já foram realizados (Tabela 1.3).

Para Cordenunsi *et al.* (2004), a quercetina foi o único flavonóide encontrado na casca. Ela está presente na subcasca em uma quantidade cinco vezes maior que na casca, não sendo detectada na semente crua. Na subcasca há também uma alta concentração de catequina. Durante o cozimento, a quercetina migrou preferencialmente para o interior da semente, enquanto a catequina migrou para ambos, semente e água de cozimento (CORDENUNSI *et al.*, 2004).

Tabela 1.3 - Compostos fenólicos presentes nas diferentes frações do pinhão

Ref.	Meio de obtenção do extrato	Compostos quantificados ^(a)	Frações do pinhão					
			Casca	Subcasca	Amêndoa cozida			
					Amêndoa crua		Sem casca ^(b)	
					Sem casca	Com subcasca	Sem casca ^(b)	Com casca ^(b)
[1]	metanol:água:ácido acético (70:30:5), incluindo a água da amostra	FT (mg/g)		345	0,23	3,21	0,11	0,54
		Q (mg/100g)	1,11	5,71	ND		ND	1,86
		C (mg/100g)		41,4				30
		FT (mg/100g)			296			1203
[2]	etanol:água (70:30)	AG (mg/100g)			0,358			0,821
		C (mg/100g)			17,49			21,08
		Q (mg/100g)			0,068			0,69
		FLA (mg/100g)			58			594,5
		PTCN (mg/100g)			22,5			2035
[3]	Água	FT (mg GAE/g)	25,03					
			51,27 ^(c)					
[4]	Água	FT (mg/g)	19,59					
		FLA (mg/g)	14,19					
		Ac.FT (mg/g)	5,40					
	Etanol puro ^(c)	FT (mg/g)	15,53					
		FLA (mg/g)	12,44					
		Ac.FT (mg/g)	3,09					
	Etanol:água (80:20) ^(c)	FT (mg/g)	20,49					
		FLA (mg/g)	2,95					
		Ac.FT (mg/g)	2,23					

Fonte: Adaptado de: [1] CORDENUNSI *et al.* (2004); [2] KOEHNLEIN *et al.* (2012); [3] SANT'ANNA *et al.* (2016); [4] FREITAS *et al.* (2018)

Nota: ^(a) FT = fenólicos totais; Q = quercetina; C = catequina; AG = ácido gálico, FLA = flavonóides, PTCN = proantocianidinas; Ac.FT = ácidos fenólicos totais; ^(b) durante o cozimento; ^(c) nas cascas após o cozimento em água; ND = não detectado pelo método empregado

Além de atuar como barreira contra a perda de minerais da amêndoa e de fornecer compostos fenólicos para a amêndoa durante o cozimento (CORDENUNSI *et al.*, 2004), os compostos fenólicos presentes na casca apresentam potencial atividade antioxidante para aplicação em outros produtos.

Mota *et al.* (2014) apontam a casca de pinhão como uma fonte renovável de moléculas ativas (por exemplo, compostos de polifenóis, flavonóides, proantocianidinas) para produtos cosméticos antienvhecimento devido a sua capacidade de capturar radicais livres. A capacidade antioxidante do extrato da casca foi mais alta que o Trolox[®], usado como referência (similar a vitamina E).

Da mesma forma, Daudt *et al.* (2015) avaliaram a aplicação de amido de pinhão e do extrato da casca em uma formulação semissólida visando o desenvolvimento de um cosmético

natural. A presença de compostos fenólicos e de atividade antioxidante proporcionaram um impacto positivo da aplicação do extrato.

Freitas *et al.* (2018) aplicaram os extratos obtidos a partir da casca de pinhão para elaboração de filme a base de zeína, a principal proteína encontrada no endosperma do milho, citada como um coproduto da obtenção do amido. Os filmes podem servir como transportadores de compostos antioxidantes em aplicações de embalagens para alimentos.

Outros estudos têm sido realizados com o intuito de aproveitamento da casca de pinhão. Sant'anna *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade e as propriedades fitoquímicas e microbiológicas de um pó obtido a partir da casca antes e depois do cozimento do pinhão. O pó foi armazenado em sacos de polietileno estéreis durante 3 meses a 25 °C. O produto mostrou-se estável em relação à degradação dos compostos fenólicos e antioxidantes. Houve um baixo crescimento de bactérias, mas foi um meio favorável à multiplicação de leveduras.

Lima *et al.* (2007) apontaram o uso da casca de pinhão como adsorvente de corante vermelho Congo e, ao invés de ser descartado após esse processo, pode ainda ser empregado para a remoção Cu (II) de soluções aquosas. Brasil *et al.* (2006) utilizaram a casca de pinhão resultante do processo de seu cozimento como um novo e barato adsorvente de Cr (VI) em soluções aquosas. Ambos os trabalhos destacam seu uso no tratamento de efluentes industriais.

Escamas (brácteas) da pinha da *Araucaria angustifolia* também foram aplicadas para bissorção de cromo (VI) e ferro. Os resultados demonstraram a possibilidade da substituição de processos tradicionais no tratamento de efluente de galvanoplastia, utilizando de uma forma mais nobre esse material que seria descartado (SANTOS; PIRES; CANTELLI, 2011).

1.5 AMIDO

A partir da glicose, as plantas sintetizam o amido nos cloroplastos em partículas denominadas grânulos (AI; JANE, 2015; PREISS, 2004). Este carboidrato se acumula devido à fixação de carbono durante a fotossíntese sendo encontrado em vários tipos de tecidos e órgãos (folhas, raízes, brotos, frutas, grãos e caules) de quase todas as plantas (PREISS, 2004).

Nos órgãos de armazenamento (fruto ou semente) a síntese de amido ocorre durante o desenvolvimento e a maturação do tecido. O amido se acumula nos amiloplastos em formas específicas de acordo com as espécies. Sendo relacionado ao padrão único de diferenciação do órgão, pode variar em forma, tamanho e composição (PREISS, 2004).

Dois diferentes polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, compõem aproximadamente 98 a 99 % do peso seco do amido. A proporção entre eles varia de acordo

com a fonte botânica, origem geográfica (clima e solo), estágio de maturação e atividade enzimática envolvida na biossíntese do amido (AI; JANE, 2015; DENARDIN; SILVA, 2009; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a). O teor e o tamanho molecular de amilose são menores em amidos das folhas do que o observado em tecidos de armazenamento (PREISS, 2004).

A amilose geralmente representa cerca 15 a 30 % da composição o amido. Quando apresentam mais de 50 % de amilose são conhecidos como amido de alto teor de amilose (*high-amylose*) e com mais de 99 % de amilopectina são conhecidas pelo termo ceroso (*waxy*) (AI; JANE, 2015; BERTOFT, 2004).

A amilose é uma cadeia essencialmente linear formada por ligações glicosídicas α -1,4, sendo ligeiramente ramificada por ligações α -1,6. O comprimento desta cadeia varia, mas em geral apresenta grau de polimerização (do inglês, *degree of polymerization*, DP) entre 500 e 5000 unidades de glicose e massa molecular de 10^5 a 10^6 g mol⁻¹. Cada molécula apresenta cerca de 9 a 20 ramificações com comprimento de cadeia (do inglês, *chain-length*, CL) entre 4 e 100 unidades de glicose. A amilose apresenta estrutura helicoidal, α -hélice, formada por pontes de hidrogênio entre os radicais hidroxila das moléculas de glicose (AI; JANE, 2015; WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

A amilopectina é uma cadeia altamente ramificada, constituída por cadeias curtas de α -1,4 com 25 a 30 unidades de glicose cada, ligadas entre si por ligações α -1,6 que correspondem de 5 a 6 % do total de ligações da molécula. Com massa molecular de 10^7 a 10^9 g mol⁻¹, a amilopectina é constituída por 10 a 500 mil unidades de glicose, sendo uma das maiores moléculas encontradas na natureza (AI; JANE, 2015; DENARDIN; SILVA, 2009; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

As propriedades tecnológicas e as características físico-químicas e funcionais dos amidos estão diretamente relacionadas com a diferença nas proporções entre amilose e amilopectina (AHMADU *et al.*, 2018; CONFORTI; LUPANO, 2008; CORDENUNSI *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2015a; ZHANG; AO; HAMAKER, 2006).

Os amidos nativos nem sempre são os mais adequados para determinadas aplicações. Para obter características necessárias a um processamento, são realizadas modificações químicas, físicas ou enzimáticas no amido nativo. Elas podem ocorrer de forma isolada ou conjunta, gerando amidos duplamente modificados, no caso de empregar dois processos (BET *et al.*, 2019; KLEIN *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2015b).

Neste trabalho serão destacadas uma modificação química e uma física aplicadas ao amido granular: a fosfatação e a moagem por moinho de bolas.

1.5.1 Modificação química do amido por fosfatação

Na maior parte dos amidos nativos, os grupamentos fosfato estão ligados covalentemente às moléculas de amilopectina, a maior parte deles como monoésteres nas posições C-6 e C-3 das unidades de glucose, sendo que a fosforilação nesta posição é característica única do amido (BLENNOW *et al.*, 2002; FENNEMA, 2010). No entanto, em amido de cereais está presente principalmente na forma de fosfolipídios (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

Em relação aos minerais presentes na composição do amido, o fósforo é aquele que parece promover maiores diferenças nas suas propriedades. Amidos nativos geralmente apresentam um baixo teor de fósforo <0,1 % (YONEYA *et al.*, 2003). Assim, para melhorar algumas propriedades do amido, o teor de fósforo pode ser aumentado através de modificação química (STAHL *et al.*, 2007).

A fosfatação é um método muito usado para esta modificação no amido. As propriedades químicas e funcionais dos amidos fosfatados dependem da fonte botânica, das condições de reação (tempo de reação, temperatura, pH, presença de catalisador) e do tipo e concentração do reagente (KAHRAMAN; KOKSEL; NG, 2015).

A partir desta reação, as ligações de hidrogênio já presentes nos grânulos são reforçadas com novas ligações covalentes, tornando o amido mais resistente ao ácido, calor e cisalhamento (HEO *et al.*, 2017) e com menor tendência a solubilizar e romper (HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015).

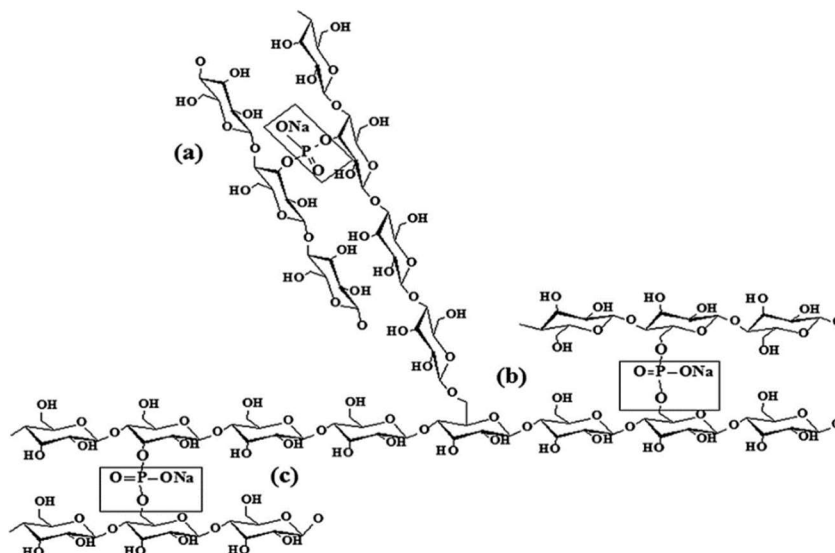
Os reagentes geralmente empregados são o tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), ortofosfato de sódio di-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de fosforila (POCl_3), o trimetafosfato de sódio ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) e a epiclorldrina ($\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$). O sulfato de sódio (Na_2SO_4) também pode ser utilizado a fim de aumentar a extensão da reação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015; LIM; SEIB, 1993; STAHL *et al.*, 2007).

Os fosfatos de amido, ou amido fosfatados, são agrupados em duas classes: monoésteres fosfato de amido e diésteres fosfato de amido, formados por ligações cruzadas (do inglês, *cross-linking*) (STAHL *et al.*, 2007; HONG, GOMAND, DELCOUR, 2015).

Os monoésteres são preparados por reação de amido granular com tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) ou ortofosfato de sódio di-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) com temperatura de 150 a 160 °C a pH 7,0. Em pH entre 8,0 e 10,0 as reações são aceleradas produzindo diésteres fosfato (STAHL *et al.*, 2007).

Segundo El-Naggar *et al.* (2015), as ligações que formam o diéster fosfato de amido podem ocorrer entre os carbonos C2-C2, C2-C3, C6-C6, C6-C2 ou C6-C3 do anel glicosídico, conforme mostrado na Figura 1.6.

Figura 1.6 - Propostas de estrutura do amido reticulado com TPS

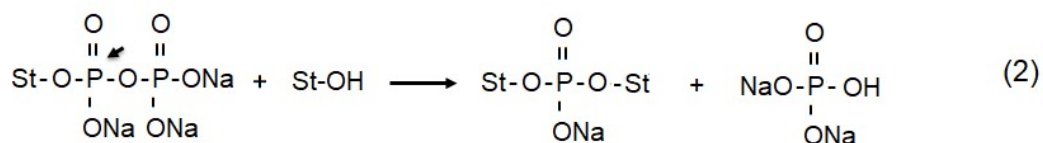
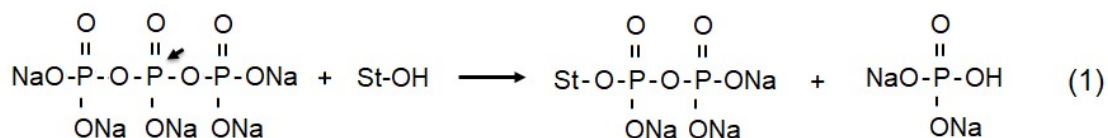


Fonte: EL-NAGGAR *et al.* (2015)

Nota: As letras indicam ligação cruzada entre: (a) C2 e C2, (b) C6 e C6 e (c) C6 e C3.

Verificando que o pH do meio reativo influenciou a proporção das ligações mono e diéster, Lim e Seib (1993) propuseram o mecanismo desta reação com tripolifosfato de sódio em $\text{pH} > 10$ (Figura 1.7) e em $\text{pH} < 9,0$ (Figura 1.8).

Figura 1.7 - Propostas de mecanismo de reação de fosfatação de amido com tripolifosfato de sódio em $\text{pH} > 10$



diéster fosfato de amido

Fonte: Adaptado de: LIM e SEIB (1993).

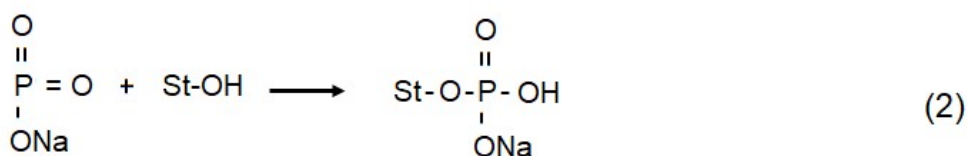
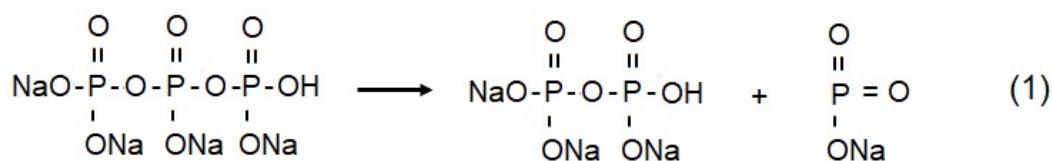
Nota: St = amido; as setas inclinadas indicam o fosfato atacado pelo hidróxi-amido

De acordo com os autores, o TPS apresenta cinco hidrogênios ionizáveis. A $\text{pH} > 10$, todos estão carregados negativamente, e a alta repulsão dificulta a reação produzindo um grau relativamente baixo de fosfatação do amido. A altas temperaturas, as hidroxilas do amido são levemente ionizadas por álcalis e podem atacar o fosfato central que carrega apenas um hidroxil ionizado, em vez dos fosfatos terminais totalmente ionizados (Reação 1 na Figura 1.7).

Através desta reação bimolecular, um pirofosfato de amido é formado com a liberação de ortofosfato. O pirofosfato de amido pode então ser atacado por um segundo grupo hidroxila de amido para obter diéster fosfato (Reação 2 na Figura 1.7).

No entanto, em $\text{pH} < 9$, os grupos fosfato terminais de tripolifosfato são protonados e pode reagir em um mecanismo unimolecular para dar monometafosfato (Reação 1 na Figura 1.8). O monometafosfato reage rapidamente com hidroxilas de amido produzindo monoésterfosfato de amido (Reação 2 na Figura 1.8)

Figura 1.8 - Propostas de mecanismo de reação de fosfatação de amido com tripolifosfato de sódio em $\text{pH} < 9$



Fonte: Adaptado de: LIM e SEIB (1993).

A quantidade de fósforo introduzida nos amidos pode ser determinada por princípio colorimétrico ou outros. A extensão da modificação química é geralmente expressa pelo grau de substituição (DS, do inglês *degree of substitution*) que é o número médio de grupos hidroxila esterificados ou eterificados, por unidade de monossacarídeo. O máximo grau de substituição possível é de 3,0 devido ao fato de todos os polissacarídeos possuírem em média três grupos hidroxila por unidade monossacarídea (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). No entanto, o amido modificado é considerado um aditivo químico em alimentos, e a legislação preconiza níveis de fósforo não superiores há 0,4 % (FAO, 2011), um limitante para o processo de fosfatação.

1.5.2 Modificação física do amido em moinho de bolas

O tratamento com moinho de bolas é empregado para modificar as propriedades dos grânulos de amido granular devido ao atrito, colisão, cisalhamento ou outras ações mecâno-químicas gerados pelos repetidos impactos de alta energia entre as bolas de moagem e a parede do recipiente no qual o amido é inserido (LIU *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2018).

Por não envolver emprego de reagentes, o tratamento é considerado ambientalmente correto (WU *et al.*, 2018). Geralmente não há adição nem de água ao processo, mas alguns trabalhos envolvem o uso de etanol anidro (DAI *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2015b).

A moagem com esferas, que podem ser de aço inoxidável ou cerâmica (HE *et al.*, 2014), é considerada um tratamento não-térmico. No entanto, além da energia mecânica envolvida no processo, as modificações do amido ocorrem provavelmente devido a energia térmica gerada pelas temperaturas relativamente altas produzidas no ponto de impacto (BEMILLER; HUBER, 2015).

As alterações que ocorrem na estrutura do grânulo do amido são graduais (MORAES; ALVES; FRANCO, 2013) apresentando relação direta com o tempo de tratamento empregado (ZHANG *et al.*, 2015b). Assim, a depender da origem botânica do amido e do grau de moagem (extensão do dano), o produto resultante poderá ser uma mistura de grânulos não danificados, grânulos danificados e fragmentos de grânulos danificado (BEMILLER; HUBER, 2015).

Durante a moagem, a estrutura semicristalina do amido nativo é destruída podendo levar a formação de estrutura amorfa e uma leve despolimerização, mesmo sem adição de calor e água (LIU *et al.*, 2011). Outras consequências do tratamento são o aumento da solubilidade em água fria, redução da temperatura de gelatinização e aumento da porcentagem de gelatinização (MORAES; ALVES; FRANCO, 2013) e redução da temperatura de pasta e do pico de viscosidade (ZHANG *et al.*, 2015b).

Alterações morfológicas também são observadas, tais como: redução de tamanho (CAVALLINI; FRANCO, 2010), aumento da área superficial (HE *et al.*, 2014), formação de fissuras e cavidades, e aumento da porosidade (MORAES; ALVES; FRANCO, 2013). Estes danos facilitam a difusão enzimática, aumentam a suscetibilidade à amilólise (HE *et al.*, 2014) e favorecem a penetração de reagentes químicos (CAVALLINI; FRANCO, 2010; ZHANG *et al.*, 2015b). Assim, o amido moído pode ser submetido a outras modificações (DAI *et al.*, 2018).

De acordo com Bemiller e Huber (2015) a moagem não é empregada comercialmente para alterar as propriedades de amido, mas para produzir farinhas.

1.6 AMIDO DE PINHÃO

1.6.1 Extração do amido de pinhão

Os amidos nativos são pouco solúveis em água fria e por isso podem ser facilmente extraídos. A extração normalmente ocorre em três etapas: processos de fragmentação anatômica, quebra celular e separação/purificação. Podem ser incluídos tratamentos químicos ou enzimáticos para acelerar o isolamento e purificar o amido (CORREIA; BEIRÃO-DA-COSTA, 2010). O ultrassom é um método físico que tem sido aplicado para extração de amido de diversas fontes botânicas. Sua aplicação aumenta o rendimento do processo e a pureza do amido, e é considerado ambientalmente correto (ZHU, 2015a). O uso destes tratamentos geralmente altera as propriedades do amido em relação àquele extraído por processos totalmente aquosos (BET *et al.*, 2019; CORREIA; BEIRÃO-DA-COSTA, 2010).

O amido de pinhão é branco e inodoro (WOSIACKI; CEREDA, 1985). O rendimento de extração é similar ao obtido para batata, mandioca e inhame, e varia entre 21 % a 36 % (LUCHESE *et al.*, 2015; SPADA *et al.*, 2013; THYS *et al.*, 2010).

A simples extração do amido de pinhão em combinação com seu alto rendimento o torna atrativo para processamento em planta piloto e para produção em escala comercial (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006) podendo ser aplicado para a indústria de alimentos (LUCHESE *et al.*, 2015).

O processo de extração do amido de pinhão inicia-se a partir do descascamento da semente. Geralmente, o pinhão é descascado manualmente, e esta é a etapa mais difícil de ser executada (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; WOSIACKI; CEREDA, 1985). Para escalas domésticas ou laboratoriais é possível utilizar faca adaptada para esta finalidade. Para escalas industriais, Cornejo *et al.* (2014) propõem uma metodologia para separação da casca e amêndoa por diferença de densidade. Neste processo, o pinhão é triturado inteiro em moinho de facas, e essa mistura é colocada em água. A polpa, mais densa, fica decantada e as cascas, que flutuam, podem ser facilmente removidas.

No entanto, este método é ineficiente para a remoção da película e do embrião, o que pode interferir na qualidade do amido isolado a partir desta farinha, devido ao alto conteúdo de lipídeos e compostos fenólicos. O amido obtido desta forma possui coloração escura e desenvolve odor de rancidez em um curto período (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006).

Assim, para obtenção de amido mais puro é necessário remover manualmente a casca, a película interna e o embrião. Bello-Pérez *et al.* (2006), reportaram que o amido de pinhão

isolado do embrião permaneceu estável após um ano de armazenamento a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$), não desenvolvendo cor escura e nem *off-flavor*. As mesmas características também foram observadas entre o amido extraído do pinhão que permaneceu congelado por um ano e aquele isolado de semente frescas.

Após a remoção da película e do embrião, a polpa é triturada em liquidificador doméstico ou de laboratório, com água fria. A relação polpa:água não é padronizada entre os diversos trabalhos, sendo utilizadas diferentes proporções tais como 1:1, 1:1,5 e 1:2, em tempos de trituração que variaram de 1,5 a 10 minutos (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014).

A polpa triturada em água é filtrada em peneiras com malhas entre 60 e 200 mesh, equivalentes ao tamanho de partícula entre 0,250 e 0,074mm, respectivamente. Para aumentar o rendimento de amido que está presente no filtrado, a torta retida na peneira pode ser triturada em água e filtrada novamente. O processo pode ser repetido várias vezes. A torta resultante é então descartada (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2014). Pinto *et al.* (2012) utilizaram um pano de algodão para remoção de parte da torta antes da filtração em peneira a 200 mesh. Wosiacki e Cereda (1985) reportaram que a torta representou 28,6 % do peso inicial do pinhão e apresenta potencial aplicação.

O filtrado, que está em suspensão aquosa, pode ser decantado naturalmente a temperatura ambiente, ou sob refrigeração (4°C), tomando-se o cuidado com o tempo a fim de evitar uma possível fermentação. Normalmente, a decantação natural é realizada em tempos que variam de 40 minutos a uma noite toda (*overnight*) (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014; HORNUNG *et al.*, 2019). Daudt *et al.* (2014) promoveram a decantação do amido de pinhão a 4°C , e o amido precipitado foi lavado com água gelada em volume similar ao sobrenadante descartado. Esse processo foi realizado quatro vezes em intervalos de decantação de 50 minutos cada.

A decantação natural pode ser substituída pela centrifugação, ou uma etapa é realizada seguida da outra, nesta ordem. Com o objetivo de reduzir ao máximo a quantidade de água presente no precipitado, a centrifugação tem sido realizada em diferentes condições tais como 9.500 rpm por 5 min ou 5.000 rpm por 10 min. Para favorecer a separação, o processo pode ocorrer em temperatura de refrigeração, de 4 a 10°C , por exemplo. O sobrenadante da decantação ou centrifugação é descartado e o amido decantado é então desidratado (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT

et al., 2014; GONÇALVES *et al.*, 2014). Outro método adicional à decantação é a filtração a vácuo, no qual o amido retido no filtro segue para desidratação (HORNUNG *et al.*, 2019).

Esta etapa geralmente é realizada em estufa, com ou sem circulação de ar forçado, em condições que variam entre 35 e 40 °C por uma noite (*overnight*) ou entre 24 h e 48 h, ou até atingir umidade menor que 11 % (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014; HORNUNG *et al.*, 2019; KLEIN *et al.*, 2013). Wosiacki e Cereda (1985) e Bicudo *et al.* (2009) lavaram o amido de pinhão com etanol e o secaram a temperatura ambiente. Já Gonçalves *et al.* (2013) utilizaram *spray-drier*, com temperatura de entrada de 90 °C e 55 °C na saída, e fluxo de 0,61 L min⁻¹.

Devido ao baixo conteúdo de proteínas no amido de pinhão, geralmente a extração é realizada sem uso de solventes orgânicos, utilizando somente água (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2015b). No entanto, alguns tratamentos adicionais de purificação dos grânulos de amido de pinhão já foram empregados.

Após a trituração da amêndoa em água, Wosiacki e Cereda (1985) trataram o sedimento com NaOH 0,15 %, o qual foi lavado exaustivamente com água e passado por uma peneira de 60 USBS. Após ressuspensão em NaOH a 0,10 %, o amido foi lavado com água até pH 6,0, passado por uma peneira 325 USBS, lavado com etanol e seco à temperatura ambiente.

Conforti e Lupano (2007) utilizaram bissulfito de sódio (NaHSO₃ 0,16 %) para quebrar as pontes dissulfeto das proteínas que podem estar ligadas aos grânulos de amido, seguida de solução 0,2 % de NaOH para dispersar as proteínas. Zortéa-Guidolin *et al.* (2016) empregaram solução aquosa 0,1 M de NaCl com 10 % de tolueno para remover proteínas.

O método de extração mais viável é aquele que não afeta as propriedades físico-químicas e mecânicas do amido, que não está associado à toxicidade, que apresenta baixo custo e promove a obtenção de um produto mais puro. Embora não exista um método capaz de extrair totalmente o amido da matéria-prima, o ideal é que se obtenha o máximo rendimento com o mínimo desperdício (BET *et al.*, 2019).

1.6.2 Composição proximal do amido de pinhão

No amido de pinhão, a amilose representa entre cerca de 20 a 30 % da sua composição, valores similares ao amido de milho e de batata, e pouco maior ao amido de mandioca (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CONFORTI; LUPANO, 2008; CORDENUNSI *et al.*, 2004; LOBO; SILVA, 2003; WOSIACKI; CEREDA, 1985). Zortéa-Guidolin *et al.* (2017) avaliaram amido de pinhão obtido a partir das sementes de sete árvores distintas do mesmo banco de

germoplasma da Embrapa Florestas, da cidade de Colombo-PR. O teor de amilose variou entre 19,7 e 24,1 %.

O teor de amilopectina normalmente é quantificado por diferença (BICUDO *et al.*, 2009). No entanto, a avaliação da estrutura molar desta macromolécula colabora com a explicação das propriedades funcionais dos amidos (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

Dessa forma, estudos da estrutura fina de amido de pinhão foram realizados por Zortéa-Guidolin *et al.* (2017) utilizando cromatografia de permeação em gel (GPC) e cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC – *high performance size exclusion chromatography*) acoplada a espalhamento de luz laser com multiângulos (*Multi-angle laser light scattering - MALLS*) e um detector de índice de refração (*Refractive index - RI*). A massa molecular da amilopectina variaram entre 3,0 e $3,9 \times 10^8$ g mol⁻¹. A distribuição do comprimento da cadeia ramificada da amilopectina das amostras foi maior para aquelas com de DP 13-24, seguidas daquelas com DP 6-12. Entre as amostras, a média de comprimento de cadeia ramificada variou de 19,7 a 21,4 unidades de glicose anidra. Pinto *et al.* (2015a) também utilizaram GPC para avaliar a estrutura molecular do amido de pinhão e a composição do amido desramificado por pulalanase e isoamilases.

Além dos carboidratos, o amido pode conter pequenos teores de substâncias acompanhantes (Tabela 1.4) tais como compostos nitrogenados, lipídeos e minerais, que podem afetar suas propriedades (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

Tabela 1.4 - Composição proximal (g 100g⁻¹) do amido de pinhão de acordo com alguns autores

Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinzas	Carboidratos	Fibra	Amido	Amilose	Ref.*
12,00	0,07	0,88	-	-	-	86,80	22,25	[1]
12,00	nd	nd	0,04	-	-	86,00	25,00	[2]
b.s.	0,31	0,14	0,32	97,47	0,86 ^(a)	-	23,54	[3]
12,21	0,35	0,47	0,44	86,53	0,39 ^(a)	69,13	26,30	[4]
-	0,51	0,38	0,27	-	-	-	26,89	[5]
6,80	0,03	0,64	0,23	92,21	-	-	22,03	[6]
6,17-7,47	0,41-0,67	0,35-0,50	0,20-0,35	87,82-89,76	1,57-3,40 ^(b)	-	23,76-26,68	[7] ^(c)
9,29	-	-	-	-	-	-	-	[8]
7,52	0,39	0,55	0,001	91,54	0,15 ^(a)	78,09	20,72	[9]
b.s.	-	-	-	-	-	99,00	-	[10]

nd = não detectado pelas metodologias utilizadas; b.s. = resultados desta linha estão apresentados em base seca; ^(a) fibra bruta; ^(b) fibra alimentar; ^(c) valor mínimo-máximo obtidos para amostras de quatro coleções de germoplasma distintas.

*Fonte: Adaptado de: [1] Wosiacki; Cereda (1985); [2] Bello-Perez *et al.* (2006); [3] Stahl *et al.* (2007); [4] Thys *et al.* (2010); [5] Pinto *et al.* (2012); [6] Anjos (2013); [7] Costa *et al.* (2013); [8] Daudt *et al.* (2014); [9] Gonçalves *et al.* (2014); [10] Pinto *et al.* (2015b)

Menores teores de substâncias acompanhantes podem indicar uma melhor extração e purificação do amido, ou seja, a composição do amido está diretamente relacionada à eficiência do processo de extração (CONFORTI; LUPANO, 2008; WOSIACKI; CEREDA, 1985).

O teor de proteínas do amido de pinhão varia entre 0,03 e 0,67 g 100g⁻¹ e o teor de lipídeos entre 0,35 e 0,88 g 100g⁻¹. A quantidade de lipídeos e proteínas do amido de pinhão são consideradas baixas em relação a outras sementes cruas, o que é uma importante característica tecnológica para sua aplicação na indústria de alimentos (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014).

O pinhão é rico em fibras, e parte delas permanece no amido após a extração (Tabela 1.4) (COSTA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014; STAHL *et al.*, 2007; THYS *et al.*, 2010).

Zortéa-Guidolin *et al.* (2017b) avaliaram a digestibilidade in vitro do amido de pinhão cozido. O conteúdo de amido rapidamente digerível foi de 88,4 a 92,6 %, amido lentamente digerível de 0,7 a 4,7 % e amido resistente entre 3,0 e 9,0 %, respectivamente. Se comparado ao amido de milho, que contém 97,2 % de amido rapidamente digerível, baixos teores de amido lentamente digerível (2,0 %) e de amido resistente (0,8 %), colaborando com o aumento do índice glicêmico, o amido de pinhão apresenta vantagens em relação aos aspectos nutricionais, proporcionando benefícios à saúde humana.

Dentre os minerais encontrados no amido de pinhão, o fósforo está naturalmente presente na ordem de 0,010 % a 0,047 %, sendo menor que o encontrado para amido de milho (0,02 %) (STAHL *et al.*, 2007) e de batata (0,052 %) (YONEYA *et al.*, 2003).

Essas características tornam o pinhão uma promissora matéria-prima para aplicações funcionais (ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017). No entanto, seus aspectos nutricionais e tecnológicos ainda são pouco explorados pela literatura científica (GONÇALVES *et al.*, 2014).

1.6.3 Propriedades térmicas do amido de pinhão

Análise Térmica é o termo utilizado para se referir a um grupo de técnicas capaz de medir uma propriedade de uma amostra em função da temperatura. Para isso, a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura, seja aquecimento ou resfriamento que pode ser ajustado para se manter constante (operação isotérmica) ou para variar linearmente com o tempo, em uma razão de aquecimento pré-definida (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

Entre as técnicas mais utilizadas para avaliação das propriedades térmicas de amido estão a Termogravimetria (TG), a Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

1.6.3.1 Termogravimetria

A Termogravimetria (TG) é a técnica na qual a variação de massa de uma substância é medida em função da temperatura. O equipamento utilizado na termogravimetria é a termobalança, que continuamente mede a massa da amostra em função da temperatura, enquanto ela é aquecida (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

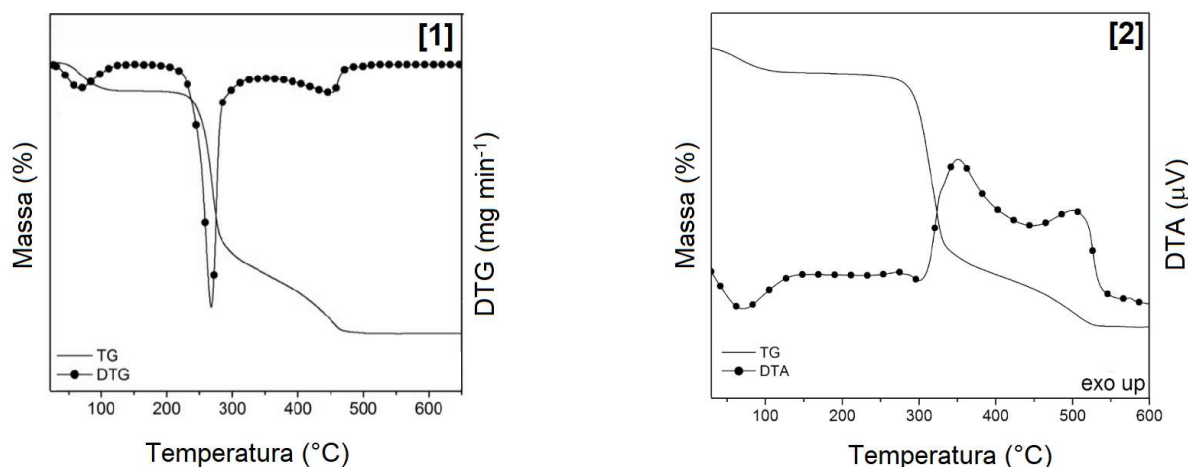
Para realização da análise de amido, a amostra é pesada diretamente no cadinho (suporte da amostra), comumente de alumina (BET *et al.*, 2019). A depender do fabricante, os fornos podem operar temperaturas até 1200 °C, 1600 °C ou 2400 °C (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014). Temperaturas até 600-650 °C são geralmente aplicadas para análises de amidos (BENINCA *et al.*, 2013a; LIU *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2018a). Além disso, a atmosfera que circunda a amostra também é controlada, sendo empregada vazão constante de gás inerte (nitrogênio) ou oxidativo (ar sintético ou oxigênio) (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

A programação de temperatura pode ser realizada de três modos distintos: isotérmica, quase-isotérmica e dinâmica, sendo esta última amplamente aplicada para análise de amidos. No modo dinâmico a amostra é aquecida com uma razão de aquecimento linear, predeterminada pelo operador do equipamento (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

O registro é a curva termogravimétrica ou curva TG picos (Figura 1.9), a qual permite obter conclusões quanto à estequiometria, estabilidade térmica da amostra, composição e estabilidade de compostos intermediários, bem como composição do produto final (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

A termogravimetria é um método frequentemente empregado para avaliar a degradação térmica da amostra (LIU *et al.*, 2019). Os amidos não-modificados geralmente apresentam uma curva TG característica. A primeira perda de massa está relacionada à desidratação da amostra, cujo valor percentual refere-se à sua umidade. Após, é verificado um período de estabilidade, sem variação de massa. A segunda e a terceira perdas de massa são eventos consecutivos e estão relacionadas com a degradação e oxidação das cadeias de amilose e amilopectina (BET *et al.*, 2018a, 2019; COSTA *et al.*, 2013).

Figura 1.9 – Curvas TG/DTG (a esquerda) e TG/DTA (a direita) típicas para amidos nativos



Fonte: Adaptado de: [1] Bet *et al.* (2016) e [2] Cordoba *et al.* (2016)

Durante a degradação térmica, o amido anidro passa por uma alteração estrutural com formação de pirodextrinas. Em temperaturas mais altas, durante a terceira perda de massa, ocorre a despolimerização com formação de levoglucosana, furfural e outros produtos voláteis de menor peso molecular (CORDOBA *et al.*, 2016). O resíduo final, em porcentagem, refere-se às cinzas (BET *et al.*, 2018a, 2019; COSTA *et al.*, 2013).

As curvas TG apresentam desníveis da perda de massa em função da temperatura. A termogravimetria derivada (DTG) é um recurso matemático que fornece a derivada primeira da curva TG em função do tempo ou da temperatura. O registro é a curva termogravimétrica derivada ou curva DTG nas quais os degraus da curva TG são substituídos por picos (Figura 1.9). A área destes picos corresponde à perda de massa naquele evento térmico, podendo ser utilizadas em determinações quantitativas (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

Durante o período de estabilidade térmica do amido, na qual não há variação de massa, a DTG retorna a linha de base, pois a derivada primeira de uma constante é igual a zero, e assim permanece até uma nova perda de massa. Além de permitir facilitar melhor distinção de uma sucessão de reações não verificadas pela curva TG, as curvas DTG indicam com exatidão as temperaturas inicial (T_i) e final (T_f) do evento térmico (perda de massa) e o instante em que a velocidade da reação é máxima (T_p) (BET *et al.*, 2016).

Os efeitos de calor associados à desidratação e decomposição do amido enquanto este é aquecido de forma dinâmica (linear) pode ser verificado pela análise térmica diferencial (DTA), realizada simultaneamente à termogravimetria (BENINCA *et al.*, 2008; CORDOBA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2013). A curva DTA picos (Figura 1.9) fornece picos que podem

ser endotérmicos ou exotérmicos, a depender da característica da reação ocorrida naquele intervalo de temperatura (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

Segundo Cordoba *et al.* (2016), a primeira perda de massa, relacionada a desidratação, apresenta um pico endotérmico correspondente. Na segunda perda de massa, há um pequeno pico endotérmico, seguido de dois picos exotérmicos, devido a degradação, carbonização e oxidação da matéria orgânica.

Costa *et al.* (2013) reforçaram o fato de a análise do teor de umidade da amostra poder ser realizada por TG, uma vez que afirmam que seus resultados são similares àqueles obtidos nas mesmas amostras pelo método oficial. A TG apresenta a vantagem de ser mais rápida e usar menor quantidade de amostra em relação ao método gravimétrico clássico.

Os resultados da curva TG são afetados por diversos fatores. Entre os fatores instrumentais destacam-se a razão de aquecimento e atmosfera do forno, e geometria do suporte de amostras e do forno. As características da amostra tais como tamanho de partículas, massa da amostra e compactação também podem interferir nos resultados da termogravimetria (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014). Desta forma, como não há uma padronização do método e das termobalanças, é difícil correlacionar dados entre diferentes pesquisas.

1.6.3.2 Calorimetria exploratória Diferencial

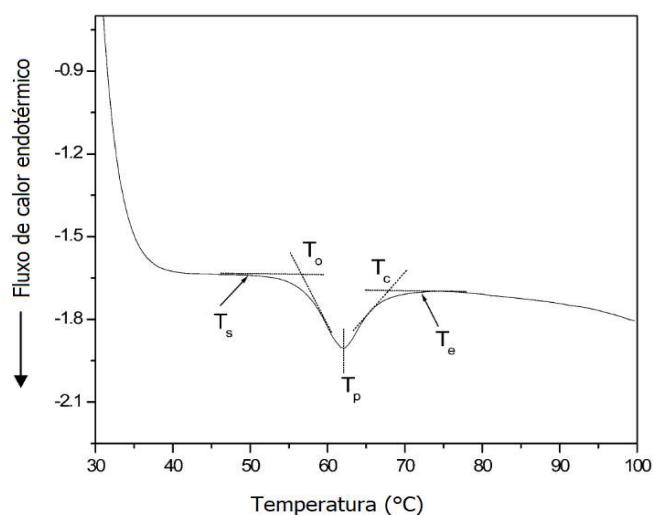
A gelatinização do amido, que normalmente acontece sob aquecimento na presença de água suficiente, inicia na região amorfa do grânulo (no hilo) e segue rapidamente para a periferia. Na temperatura de gelatinização, as pontes de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina tornam-se mais fracas e são rompidas, promovendo redução da cristalinidade pela destruição da região cristalina, o que possibilita a entrada e rápida absorção de água pela região amorfa do grânulo, induzindo a um aumento da viscosidade da solução com formação de pasta e fazendo com que o grânulo se rompa e perca a birrefringência, isto é, não se visualiza mais a cruz de malta sob luz polarizada. Dessa maneira, o empastamento envolve inchamento granular, exsudação dos componentes granulares moleculares e, eventualmente, total rompimento dos grânulos (AI; JANE, 2015; RATNAYAKE; OTANI; JACKSON, 2009; SINGH *et al.*, 2003; WANG; COPELAND, 2013).

A gelatinização de amidos pode ser verificada pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), uma técnica termoanalítica que fornece informações sobre as temperaturas de início - onset (T_o), de pico (T_p), e final (T_f) e define proporcionalmente a energia requerida no evento, ou seja, a variação da entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}). (BENINCA *et al.*, 2013b;

JAMBRAK *et al.*, 2010; WANG; COPELAND, 2013). Os dados fornecem uma curva DSC típica para amido (Figura 1.10).

A DSC fornece informações valiosas sobre o fenômeno ordem-desordem dos grânulos de amido em soluções aquosas durante a gelatinização (WANG; COPELAND, 2013). As temperaturas e a entalpia de gelatinização do amido, medidas por DSC, podem relatar as características do grânulo do amido e o seu grau de cristalinidade. A temperatura de pico T_p dá uma medida da qualidade cristalina (comprimento da dupla hélice). A entalpia de gelatinização ΔH_{gel} dá uma medida total da qualidade e quantidade de cristalinidade e é um indicador da perda da ordem molecular dentro do grânulo (AI; JANE, 2015; SINGH *et al.*, 2003).

Figura 1.10 - Ilustração esquemática das temperaturas de transição T_o (temperatura inicial ou onset), T_p (temperatura de pico) e T_f (temperatura final)



Fonte: Adaptado de: Wang e Copeland (2013)

Bello-Pérez *et al.* (2006) avaliaram a temperatura de gelatinização de amido de pinhão após 7 e 14 dias armazenadas a 4 °C. Antes da análise de DSC, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora. A temperatura de gelatinização do amido de pinhão (63,46 °C) foi menor em relação a do amido de milho (73,06 °C) e, para ambos, decresceu durante o tempo de armazenamento. A entalpia de gelatinização também é menor (8,06 J g⁻¹ para o amido de pinhão e 13,16 J g⁻¹ para o de milho), indicando a baixa energia requerida para desorganização dos componentes do amido. Os resultados de temperatura de gelatinização obtidos por Conforti e Lupano (2007) são similares, no entanto a entalpia de gelatinização é maior (10,3 J g⁻¹).

Diferentes resultados entre diferentes autores são devido ao fato de que as medições de entalpia de gelatinização não são muito precisas (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CONFORTI;

LUPANO, 2007). De fato, os fatores instrumentais ou operacionais relacionados à análise térmica podem alterar as curvas DSC (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

Bicudo *et al.* (2006) realizaram a DSC em diferentes condições: para a 1ª condição foi preparada uma mistura 4:1 (água:amido m/m) e deixada durante duas horas de agitação para equilibrar o teor de umidade. Com uma micropipeta foram transferidos 10 µL desta suspensão para um cadinho de alumínio, que foi selado e submetido à análise DSC. Na segunda condição uma suspensão 10:1 (água:amido m/m) foi preparada diretamente no cadinho com 1,0 mg de amido e a esta massa foram adicionados 10 µL de água. O cadinho de alumínio foi selado e após uma hora foi realizada uma nova curva DSC. A terceira condição a proporção foi de 5:1 (água:amido m/m), preparada diretamente com 2,0 mg de amido ao qual foram adicionados 10 µL de água. O cadinho de alumínio foi selado e após uma hora uma nova curva DSC foi realizada.

Os resultados de DSC obtidos em função das diferentes condições (Tabela 1.5) demonstram que somente a entalpia de gelatinização foi alterada significativamente, aumentando de 2,4 J g⁻¹ na primeira condição para 6,5 J g⁻¹ na terceira condição (BICUDO *et al.*, 2009).

Tabela 1.5 - Resultados de DSC do amido de pinhão realizada em diferentes condições analíticas

Referência	Condição empregada - Proporção água:amido (m/m)	ΔH_{gel} (J g ⁻¹)	Tp (°C)
[1]	1ª condição - 4:1	2,2	50,9
[1]	2ª condição - 10:1	2,4	49,8
[1]	3ª condição - 5:1	6,5	50,8
[2]	Proporção 4:1	15,8	62,5
[3]	Proporção 4:1	14,0	55,5
[4-a]	Proporção 4:1	12,5 – 14,5	58,3 – 64,5
[4-b]	Proporção 4:1	3,7 – 6,9	49,4 – 51,8

Fonte: Adaptado de: [1] Bicudo *et al.* (2009); [2] Cordoba; Bet e Schnitzler (2015); [3] Daudt *et al.* (2014); [4] Zortéa-Guidolin *et al.* (2017), menor - maior valores para amidos nativos (a) e retrogradados (b)

Embora os autores não tenham discutido os resultados, percebe-se que a proporção água:amido influencia os resultados de ΔH_{gel} . A 2ª e a 3ª condição foram realizadas seguindo a mesma metodologia, mas em diferentes proporções de água, tendo o dobro de água disponível para a gelatinização na 2ª condição. No entanto, comparando-se a 1ª e a 3ª condição, onde tem-se metodologia diferentes e uma diferença na proporção de água:amido mais próxima que no caso anterior, também há diferença nos resultados de ΔH_{gel} . Dessa forma, pode-se inferir que

ambos, proporção de água:amido e metodologia, influenciam a entalpia de gelatinização. Isso pode ocorrer porque na primeira condição, uma alíquota de 10 μ L da solução foram transferidos para o cadinho, mas com incerteza na proporção água:amido efetivamente inseridas no cadinho.

A temperatura de gelatinização não sofreu alterações significativas, independente da metodologia ou da proporção água:amido empregada.

Cordoba; Bet e Schnitzler (2015) também empregaram a proporção água:amido de 4:1, utilizando a segunda metodologia empregada por Bicudo *et al.* (2009), mas em diferentes razões de aquecimento e de fluxo de ar. O valor da ΔH_{gel} foi superior ao encontrado por aqueles autores. Para Daudt *et al.* (2014) os valores de entalpia foram similares aos de Bicudo *et al.* (2009) com temperatura de gelatinização 7 °C menor.

Além da metodologia, outros fatores, inerentes à própria amostra podem influenciar os resultados de DSC, especialmente a proporção amilose/amilopectina, que está relacionada diretamente ao evento de gelatinização.

Zortéa-Guidolin *et al.* (2017a) avaliaram sete amostras de amido oriundos de pinhão maduros colhidos em diferentes épocas. Os seus resultados apontam correlação entre o conteúdo de amilose e as temperaturas de gelatinização. Além disso, afirmam que grânulos de amido com maior conteúdo de cadeias laterais longas de amilopectina tendem a apresentar temperaturas de gelatinização mais elevadas. Os resultados de ΔH_{gel} e T_p foram similares aos encontrados por Costa *et al.* (2013) (Tabela 1.5).

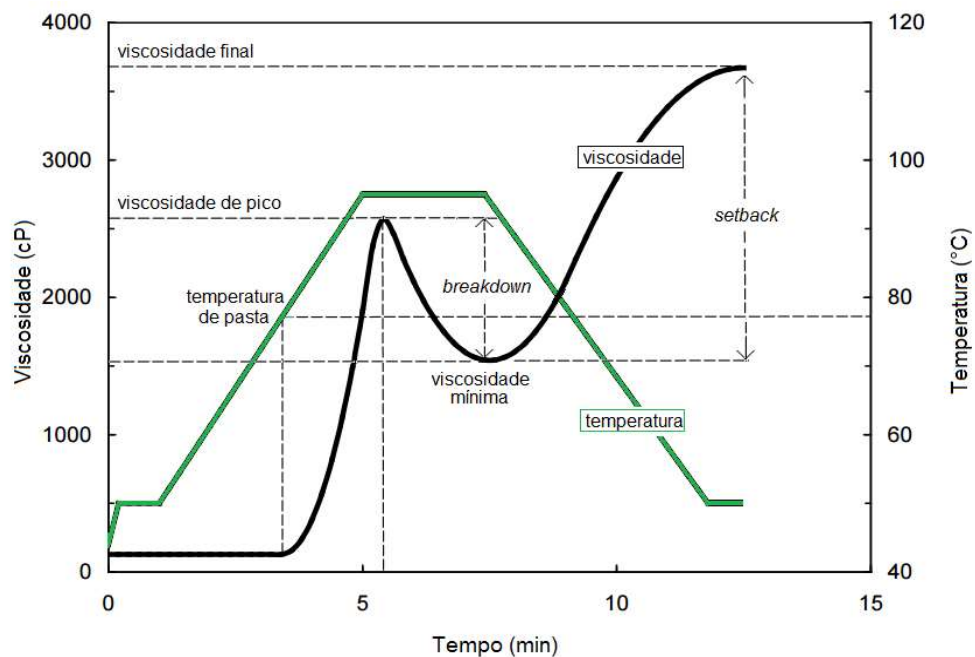
Os autores também realizaram a DSC em amostras de amido retrogradadas e verificaram uma redução na temperatura e na entalpia de gelatinização para todas as amostras em relação ao amido nativo. O baixo valor de entalpia de gelatinização encontrados por Cordoba; Bet e Schnitzler (2015) são similares àqueles de amidos de pinhão retrogradadas obtidos por Zortea-Guidolin *et al.* (2017).

Ribeiro *et al.* (2014) avaliaram o efeito da adição de glicose, frutose, mistura de glicose e frutose, e sacarose em amido de pinhão nativo. A entalpia de gelatinização foi maior para o amido nativo (22,95 J g⁻¹) e decresceu para aquele tratado com glicose (14,38 J g⁻¹), frutose (13,33 J g⁻¹), sacarose (12,82 J g⁻¹) e glicose-frutose (12,11 J g⁻¹). Os autores justificam o decréscimo dos valores em função da baixa concentração de açúcar empregada (1 %) e pelo fato de a extração do amido ter sido realizada sem o emprego de produtos químicos, uma vez que dados similares foram observados em estudo com amido de mandioca orgânica.

1.6.4 Propriedades de pasta do amido de pinhão

Devido a capacidade de absorção de água dos amidos em função da temperatura, quando uma suspensão de amido é aquecida e em seguida é refrigerada há uma alteração na sua viscosidade, que pode ser monitorada ponto a ponto produzindo um viscoamilograma típico (Figura 1.11).

Figura 1.11 - Ilustração esquemática de viscoamilograma obtido por RVA



Fonte: Adaptado de: Newport Scientific (2010)

O visco-analisador rápido (RVA, do inglês *rapid visco-analyser*) é um viscosímetro que mede a resistência de uma amostra ao cisalhamento durante aquecimento e resfriamento controlado. É amplamente utilizado para avaliar os parâmetros de temperatura de início de formação de pasta, viscosidade máxima, tempo para atingir esse pico, quebra da viscosidade, viscosidade final e capacidade de retrogradação em dispersões de amido, dados que têm sido relacionados com qualidade e textura de produtos alimentícios (AI; JANE, 2015; COPELAND *et al.*, 2009; SORBA; SOPADE, 2013; ZORTÉA *et al.*, 2011).

O viscoamilograma obtido por RVA (Figura 1.11) apresenta duas curvas distintas, a primeira indica a variação da temperatura na qual a amostra está submetida, enquanto que a segunda aponta o seu comportamento reológico, ambas em função do tempo.

Inicialmente a amostra está a uma temperatura menor àquela requerida para a gelatinização, portanto apresenta uma baixa viscosidade. Com o aumento da temperatura, há aumento da viscosidade. A temperatura de pasta é aquela em que há o início do aumento de

viscosidade da suspensão. Ela fornece uma indicação da temperatura mínima necessária para cozinhar uma dada amostra, o que pode implicar na estabilidade de outros componentes da fórmula e indicar custos de energia (NEWPORT SCIENTIFIC, 2010). Costa *et al.* (2013) verificaram que as temperaturas gelatinização de quatro amostras de amido de pinhão obtidas por DSC foram diretamente proporcionais à temperatura de pasta obtida por RVA.

Com a elevação gradual da temperatura e, devido a intensa absorção de água com consequente inchamento granular, há um aumento repentino da viscosidade da solução até um ponto máximo. A viscosidade máxima indica, portanto, a capacidade de ligação da água ao amido (SHI *et al.*, 2015).

A partir desse momento, numa etapa de cozimento, a temperatura é mantida constante, normalmente a 95 °C, enquanto o amido gelatinizado é submetido simultaneamente a agitação mecânica. Não é possível determinar as propriedades de pasta de amidos com temperatura de gelatinização maior, como é o caso do amido de milho com alto teor de amilose, cuja gelatinização ocorre a temperatura maior que 150 °C. A medida em que os grânulos se rompem parcial ou totalmente, há uma liberação de polissacarídeos na água de cozimento, com consequente diminuição da viscosidade a um valor mínimo. O intervalo entre as viscosidades máxima e mínima pode ser medido, e é denominado quebra da viscosidade (*breakdown*). A intensidade de decréscimo da viscosidade aparente desta pasta revela a capacidade de o grânulo suportar a tensão de cisalhamento e aquecimento simultâneos. Essa estabilidade ao cozimento sob agitação é um parâmetro importante para muitos processos (NEWPORT SCIENTIFIC, 2010; PINTO *et al.*, 2012; ZORTÉA *et al.*, 2011).

Na etapa seguinte, a medida em que a temperatura diminui, as cadeias polissacarídicas tendem a reassociar-se aumentando a viscosidade aparente até um valor final. Esse valor, chamado de viscosidade final é o parâmetro mais utilizado para definir a qualidade de uma determinada amostra, uma vez que indica a capacidade do material para formar uma pasta ou gel viscoso após cozimento e resfriamento (AI; JANE, 2015; COPELAND *et al.*, 2009; SORBA; SOPADE, 2013)

A diferença entre a viscosidade mínima e a viscosidade final indica a tendência à retrogradação da amostra, que pode ser bastante marcada e está associada com a resistência a sinérese. Esse intervalo é calculado e denominado *setback*. Amidos com menores valores de *setback* indicam menor tendência à retrogradação, ou seja, eliminam menor quantidade de água na determinação gravimétrica da sinérese (AI; JANE, 2015; COPELAND *et al.*, 2009; NEWPORT SCIENTIFIC, 2010; SORBA; SOPADE, 2013; STAHL *et al.*, 2007; ZORTÉA *et al.*, 2011).

Os dados obtidos no viscoamilograma são normalmente apresentados no formato de tabela. Os resultados de RVA do amido de pinhão nativo obtido por diferentes autores estão apresentados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 – Resultados de RVA de amido de pinhão e milho nativo obtidos por diferentes autores

Autor	Temperatura de Pasta (°C)	Viscosidade de pico (m Pas)	<i>Breakdown</i> (m Pas)	<i>Setback</i> (m Pas)	Viscosidade final (m Pas)
Amido de pinhão					
[1]	68,0	5595,0 ± 48,08	2275,0 ± 0,00	1752,5 ± 7,18	5071,5 ± 40,31
[2] (a)	68,13 ± 0,16	3011,60 ± 1,22	1840,59 ± 1,23	1354,47 ± 3,93	2530,48 ± 1,84
[2] (d)	62,26 ± 0,46	2743,51 ± 3,13	1543,71 ± 4,67	1487,41 ± 2,51	2692,53 ± 2,16
[3]	65,98 ± 0,04	3258,50 ± 0,71	1432,40 ± 0,57	1747,25 ± 0,35	2943,00 ± 1,41
[4]	86 ± 2	5778 ± 110	-	-	3564 ± 510
[5] (7)	59,4 ± 0,2	2616,0 ± 29,7	797,5 ± 14,9	1136,5 ± 31,8	2955,0 ± 17,0
[5] (1)	62,1 ± 0,2	2328,0 ± 94,7	962,5 ± 24,8	1226,0 ± 25,5	2591,5 ± 95,5
Amido de milho					
[1]	78,0	4347,0 ± 8,49	1881,0 ± 83,44	2067,5 ± 81,32	4534,5 ± 4,95

Fonte: Adaptado de: [1] Mucillo (2009); [2] Costa *et al* (2013); [3] Cordoba, Bet, Schnitzler (2015); [4] Daudt *et al* (2016); [5] Zortéa-Guidolin *et al* (2016)

Stahl *et al.* (2007) demonstraram que o amido de pinhão nativo apresenta menores temperaturas de pasta e de pico, e maior viscosidade de pico, *breakdown*, *setback* e viscosidade final quando comparadas ao amido de milho. De fato, o pico de viscosidade de amido de cereais é menor devido ao seu baixo poder de inchamento (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

Os resultados dos parâmetros de RVA são diferentes entre os diversos autores (Tabela 1.6). De acordo com Costa *et al.* (2013) é possível que haja uma discrepância nos valores uma vez que são sementes produzidas em diferentes regiões.

Diversos estudos demonstram que as características reológicas, em especial as de viscosidade, poder de inchamento e retrogradação são afetadas pelas variações genéticas, condições de solo e climáticas, idade da cultura e época de colheita pois afetam a estrutura molecular do amido. Além disso, condições experimentais e de processo de extração do amido também podem influenciar o resultado (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013).

Os teores de amilose são normalmente correlacionados com valores de *breakdown* mais elevados e apresentam uma correlação negativa com o pico de viscosidade, ou seja, amidos com baixo teor de amilose apresentam altos picos de viscosidade, mantendo proporcionalidade. Maiores valores de *setback* são encontrados para amidos com maiores diâmetros, devido à

maior fragilidade estrutural encontrada em grânulos maiores (AI; JANE, 2015; COPELAND *et al.*, 2009; DAUDT *et al.*, 2016).

Por apresentarem alta viscosidade a uma baixa temperatura, o amido de pinhão apresenta possibilidade de aplicações diferenciadas em relação ao amido de milho, especialmente para aqueles produtos com ingredientes termossensíveis (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006).

Ribeiro *et al.* (2014) avaliaram o efeito da adição de 1 % de açúcares nas propriedades de pasta de amido de pinhão nativo. A temperatura de pasta permaneceu próxima aos 66 °C para todas as amostras. O aumento da concentração de açúcar no amido geralmente diminui o pico de viscosidade, no entanto houve pequenas diferenças (2280 a 3259 mPa s) devido à baixa concentração de açúcares empregada. A viscosidade final foi maior para a amostra de amido (2944 mPa s) e menor para aquela tratada com glicose e frutose (2239 mPa s).

Zortéa-Guidolin *et al.* (2017a) verificaram que a temperatura de pasta variou de 59,4 a 62,1 °C, estando diretamente relacionada com a temperatura de gelatinização avaliada por DSC.

1.6.5 Retrogradação do amido de pinhão

A retrogradação é o fenômeno que ocorre durante o resfriamento das soluções aquosas de amido. Nesse momento, o amido solubilizado e os grânulos remanescentes reassociam-se em uma estrutura ordenada (dupla hélice) que pode se desenvolver em forma cristalina, tornando-se menos solúvel. Sabe-se que os cristais começam a dar forma eventualmente e que este processo é acompanhado por um aumento gradual na rigidez. Dependendo do tipo e da concentração de amido, a estrutura final será uma solução pastosa ou um gel, cuja diferença está na fluidez, uma vez que a pasta tem uma certa fluidez e o gel tem uma forma definida sem fluidez (AI; JANE, 2015; PAREDES-LÓPEZ; BELLO-PÉREZ; LÓPEZ, 1994).

Quando a amilose é liberada para a solução, as ligações de hidrogênio são prontamente formadas para produzir géis rígidos e opacos. No entanto, devido à sua estrutura ramificada, a fração de amilopectina tem uma capacidade limitada para a ligação de hidrogênio e as suas soluções permanecem relativamente claras e fluidas. Dessa forma, géis com cerca de 25 % de amilose produzem uma rede e são mais firmes que aqueles produzidos por géis de amido ceroso, que contêm agregados, mas sem redes (AI; JANE, 2015; COPELAND *et al.*, 2009).

A amilose e a amilopectina retrogradam em diferentes períodos. Enquanto a retrogradação leva minutos ou horas para a amilose, a amilopectina pode demorar horas ou dias,

dependendo da capacidade das cadeias ramificadas para formar associações (COPELAND *et al.*, 2009; PAREDES-LÓPEZ; BELLO-PÉREZ; LÓPEZ, 1994).

O conteúdo de amilose foi descrito como sendo um dos fatores que influencia a retrogradação do amido. Uma maior quantia de amilose tem sido tradicionalmente ligada como uma maior tendência a retrogradação nos amidos, mas a amilopectina, materiais intermediários, tamanho e forma dos grânulos e fonte botânica, também tem um papel importante na retrogradação durante armazenamento refrigerado (COPELAND *et al.*, 2009; PAREDES-LÓPEZ; BELLO-PÉREZ; LÓPEZ, 1994; SINGH *et al.*, 2003).

Tanto a DSC quanto o RVA, são utilizados para avaliar a retrogradação em amidos. Bello-Perez *et al.* (2006) avaliaram a entalpia de retrogradação do amido de pinhão por DSC. As amostras (2mg) foram pesadas diretamente nos cadinhos aos quais foram acrescentadas água deionizada suficiente para o preparo de suspensões com 65-75 % (m/m) de água (em base seca). Os cadinhos foram aquecidos em forno a 105 °C por 15 minutos e armazenadas por 7 e 14 dias a 4 °C. Após o tempo de armazenamento, os cadinhos permaneceram por 1 hora a temperatura ambiente antes da análise.

Os resultados apontam que a temperatura de gelatinização do amido de pinhão decresce com o tempo de armazenamento (56,0 °C aos 7 dias e 50,8 °C aos 14 dias), enquanto a do amido de milho continua estatisticamente igual, a aproximadamente 53,7 °C. A retrogradação do amido de pinhão continua com o tempo de armazenamento, uma vez que a entalpia é maior aos 14 que aos 7 dias, com valores de 4,2 e 1,7 J g⁻¹, respectivamente. O amido de milho apresenta característica semelhante, mas com entalpias de retrogradação maiores que a do amido de pinhão (5,0 J g⁻¹ aos 7 dias e 6,5 J g⁻¹ aos 14 dias), ou seja, o amido de pinhão apresenta uma menor tendência a retrogradação (*setback*) do que o amido de milho (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006).

Cordoba; Bet e Schnitzler (2015) realizaram modificação do amido do pinhão com ácido láctico (0,1 e 0,2 mol L⁻¹). As curvas de RVA mostram uma diminuição no pico de viscosidade e viscosidade final das amostras modificadas bem como um menor *setback*. A temperatura de viscosidade foi menor e semelhante entre as amostras modificadas, mas diferiram estatisticamente da amostra nativa. Segundo eles, os resultados favorecem o uso de amido de pinhão modificado com ácido láctico em molhos, sopas e indústrias de panificação.

Baixos valores de *setback* (CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015; WOSIACKI; CEREDA, 1985) são uma vantagem para a aplicação do amido de pinhão, especialmente em produtos armazenados durante um longo período de tempo e em que a textura macia é necessária (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006).

1.6.6 Propriedades estruturais do amido de pinhão

Quando moléculas lineares (amilose) e ramificadas (amilopectina) estão associadas paralelamente, suas cadeias são mantidas juntas por pontes de hidrogênio, o que resulta no aparecimento de regiões cristalinas ou micelas. As cadeias ramificadas da amilopectina formam dupla-hélice, contribuem para a cristalinidade do grânulo de amido e correspondem de 15 a 45 % da sua massa. A região amorfa consiste principalmente em amilose e segmentos de cadeia interna de amilopectina. Devido a esta organização estrutural, quando observados através de luz polarizada, todos os grânulos de amido nativo aparecem claros, enquanto exibem uma “cruz de Malta” escura. Esta birrefringência, não implica necessariamente em uma forma cristalina, mas indicam um alto grau de orientação das moléculas de glicose (GONÇALVES *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2015a; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

Qualquer situação que cause um colapso na ordem cristalina dos grânulos manifesta mudanças irreversíveis na sua estrutura e afeta diretamente suas propriedades funcionais, tais como inchamento do grânulo, perda de birrefringência óptica, desenrolamento e dissociação da dupla hélice e solubilidade do amido (SINGH *et al.*, 2003).

Duas técnicas são amplamente empregadas para caracterização estrutural de amidos: a difratometria de raios X pelo método do pó (DRX) e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

1.6.6.1 Difratometria de raios X pelo método do pó (DRX)

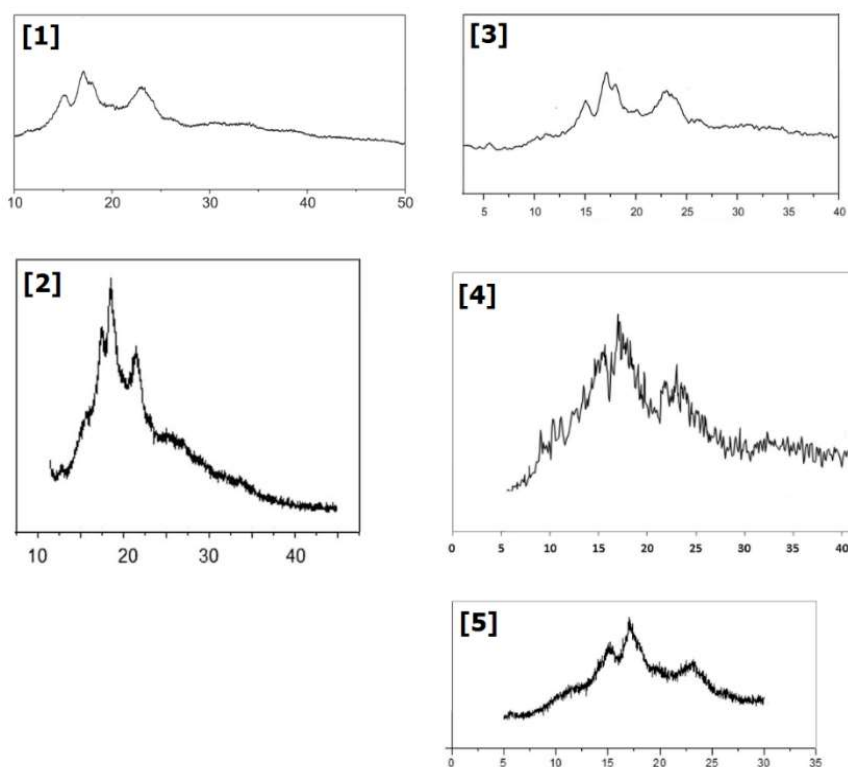
A depender do comprimento de cadeia que compõem a rede de amilopectina, da densidade de empacotamento dentro dos grânulos e da presença de água, o padrão de cristalinidade do amido pode ser dividido em três principais padrões, os tipos A, B e C (CAI *et al.*, 2014). Adicionalmente, quando moléculas de amilose associam-se com lipídeos no grânulo de amido, é visualizado um padrão de raios X tipo-V, que é parcialmente resistente à digestão enzimática (CAI *et al.*, 2014; LOBO; SILVA, 2003; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; SINGH *et al.*, 2003).

O padrão tipo-A é denso com menos espaço para moléculas de água e geralmente encontrado em amidos de cereais. O tipo-B pode prender quatro vezes mais moléculas de água e é observado em amido de banana verde, de milho com alto teor em amilose e para a maioria dos amidos de tubérculos e raízes, como a batata. O tipo-C é encontrado frequentemente em amidos de leguminosas e sementes, sendo considerado por alguns autores, uma combinação

dos tipos A e B. Com relação ao comprimento de cadeia da amilopectina, a estrutura tipo-A, -B e -C contém de 23 a 29, 30 a 44, e 26 a 29 moléculas de glicose respectivamente (BENINCA *et al.*, 2019; CAI *et al.*, 2014; CONFORTI; LUPANO, 2007; DAUDT *et al.*, 2014).

A DRX é uma técnica amplamente empregada para avaliar o padrão de cristalinidade dos grânulos de amido e sua cristalinidade relativa, ou seja, a relação entre região cristalina e amorfa. As curvas de difração de raios X, ou difratogramas, apresentam picos em diferentes posições, ou seja, em diferentes ângulos de difração 2θ , o que possibilita a caracterização do amido entre os padrões supracitados (Figura 1.12).

Figura 1.12 - Difratogramas de raios X de amido de pinhão nativo segundo alguns autores



Fonte: Adaptado de: [1] Costa *et al.* (2013); [2] Gonçalves *et al.* (2014); [3] Zortéa-Guidolin *et al.* (2017); [4] Daudt *et al.* (2014) e [5] Pinto *et al.* (2015b)

Nota: eixo X das figuras = Ângulo de difração (2θ); eixo Y das figuras = Intensidade

O padrão tipo-A apresenta fortes singletes em 15° e 23° e um dublete fraco em torno de 2θ igual a 17° e 18° . O padrão tipo-B possui um forte singlete em 2θ igual a 17° e alguns picos ao redor de 15° , 20° , 22° e 24° e apresenta um pico adicional característico ao redor de $5,6^\circ$. O padrão tipo-C apresenta singletes em 17° e 23° , e alguns pequenos picos ao redor de $5,6^\circ$ e 15° . Alguns picos do padrão tipo-C podem ser similares ao tipo-A ou tipo-B, caracterizando-o com

tipo- C_A ou - C_B , respectivamente. O tipo- C_A apresenta um ombro em cerca de 18° e um forte singlete a 23° . Já o tipo- C_B apresenta dois ombros em cerca de 22 e 24° (CAI *et al.*, 2014).

Costa *et al.* (2013) verificaram picos de difração com maior intensidade ao redor de 15° , 17° e 23° . De acordo com os autores, o padrão obtido é similar ao reportado por Conforti e Lupano (2007). Estes observaram picos intenso nas mesmas posições e descrevem que, mesmo que o dublete em 17 e 18° não seja evidente, trata-se de um padrão compatível com o tipo-A. Gonçalves *et al.* (2014) também evidenciaram padrão tipo-A, sendo os picos predominantes um dublete ao redor de 18° e um singlete a 22° .

No entanto, Zortéa-Guidolin *et al.* (2016) descrevem o padrão de cristalinidade tipo-C para o amido de pinhão, com picos ao redor de 5° , 15° , 17° , 22° e 23° . Para Daudt *et al.* (2014), o difratograma com picos a 2θ em 15° , 17° , 22° e 23° confirma o padrão tipo-C. Pinto *et al.* (2012) verificaram picos a 15° , 17° e 23° e um a $5,7^\circ$. Assim, o caracterizaram como tipo- C_A .

A diferença nos resultados destes trabalhos (Figura 1.12) podem ter ocorrido devido à metodologia empregada na análise ou ao uso da função ‘*smooth*’ durante o tratamento dos resultados, o que colabora para redução de ruídos mas pode suavizar demasiadamente alguns picos menos intensos (ROA *et al.*, 2014).

Na metodologia descrita nos trabalhos Zortéa-Guidolin *et al.* (2016) e Daudt *et al.* (2014), a região de varredura dos ângulos (2θ) foi de $3-40^\circ$ e $4-40^\circ$, respectivamente. Para Costa *et al.* (2013) variou entre $5-50^\circ$, no entanto a escala na figura com os resultados inicia em 10° . Gonçalves *et al.* (2014) não descrevem claramente, mas nos resultados é possível observar que a região variou entre aproximadamente 10 e 45° . Para Pinto *et al.* (2015) a região de varredura foi entre 5 e 30° .

De acordo com estas informações, sugere-se iniciar a varredura em $2\theta \leq 5^\circ$, de forma a garantir a visualização de um possível pico ao redor de $5,6^\circ$. Não há necessidade de que o ângulo final seja maior que 30° já que os picos de interesse se encontram abaixo deste valor.

A cristalinidade relativa dos grânulos de amido pode ser quantitativamente estimada. Ela é calculada pela relação entre a área dos picos e a área total do difratograma. Para o amido de pinhão, varia entre $25,4$ e $30,7\%$ (COSTA *et al.*, 2013; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a).

1.6.6.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Quando uma amostra é submetida a região do infravermelho médio ($400-4000\text{ cm}^{-1}$), através dos espectros obtidos pela FTIR, é possível identificar os grupos funcionais ou ligações

químicas a partir do registro de sua vibração em frequências específicas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Pinto *et al.* (2015a) utilizaram FTIR acoplada com Refletância Total Atenuada (ATR) e verificaram que amido de pinhão exibe mais de 10 picos na região de 4000-800 cm^{-1} . As bandas associadas ao alongamento da ligação O-H e C-H estão entre 3422 e 2928 cm^{-1} . A 1650 cm^{-1} ao alongamento C-O-C, e a flexão de C-H a 1460 cm^{-1} . A vibração da deformação C-O-H é atribuída à absorbância a 1010 cm^{-1} e entre 925 e 860 cm^{-1} estão as bandas de flexão C-H. De acordo com Kizil; Irudayaraj e Seetharaman (2002), o espectro infravermelho de amido em baixo número de onda ($< 800 \text{ cm}^{-1}$) são complexos devido às vibrações esqueléticas do anel glicose-pirano.

O FTIR pode ser empregado para monitorar as alterações que ocorrem na estrutura molecular do amido, tais como ordem estrutural, cristalinidade e retrogradação, além do teor de água (CAPRON *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2015a). Também pode identificar possíveis interações do amido com outros componentes utilizados para modificação química ou produção de derivados, como biofilmes, por exemplo (DAUDT *et al.*, 2016).

Uma banda ao redor de 1022 cm^{-1} caracteriza a região amorfa do grânulo enquanto a 1047 cm^{-1} relaciona-se à região cristalina, sendo esta composta por sobreposição de duas bandas em 1040 e 1053 cm^{-1} . A banda a 1040 cm^{-1} e a formação de hélices se desenvolvem por várias horas durante a retrogradação, enquanto a banda a 1053 cm^{-1} aumenta por períodos mais longos com a agregação e cristalização das moléculas de amido (CAPRON *et al.*, 2007).

O cálculo da razão da intensidade das bandas 1045/1022 cm^{-1} representa a relação entre a região cristalina e amorfa no grânulo, sendo que maiores valores indicam maior fase cristalina no amido. A razão espectral 1045/1022 cm^{-1} para o amido de pinhão nativo foi de 0,71. Quando o amido foi modificado por tratamento hidrotérmico, o valor foi diminuindo a medida em que houve aumento de umidade e do calor no tratamento, indicando maior formação de estruturas amorfas no amido (PINTO *et al.*, 2015a).

No entanto, a razão 1045/1022 é muito sensível ao teor de água da amostra (PINTO *et al.*, 2015a). Assim, para o amido no estado hidratado, a razão entre os picos 1000/1022 cm^{-1} é mais recomendada para indicar (mas não quantificar completamente) se um amido possui níveis altos ou baixos de estrutura ordenada (WARREN; GIDLEY; FLANAGAN, 2016).

Para Daudt *et al.* (2016), que avaliaram espectros FTIR para filmes comestíveis obtidos a partir de amido de pinhão, as diferentes intensidades das bandas entre 2800 e 3000 cm^{-1} podem ser atribuídas à razão amilose e amilopectina, sendo que quanto maior a

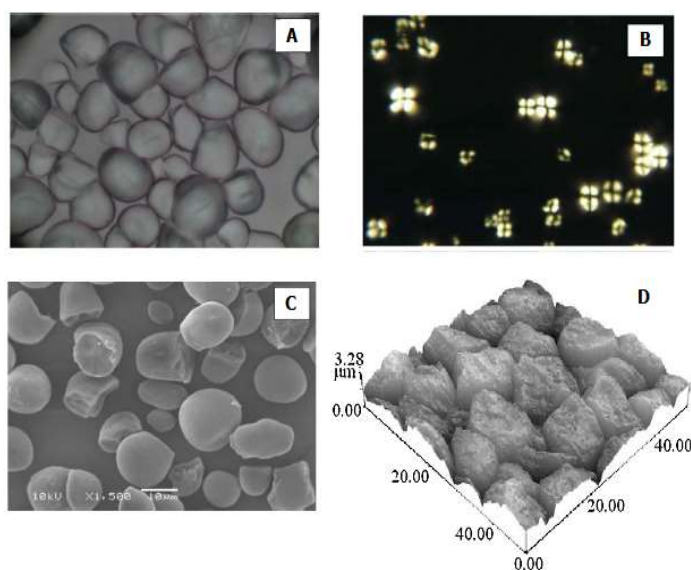
intensidade, maior o teor de amilose. Os autores citam também que à medida que a cristalinidade dos amidos aumenta, a banda a 1637 cm^{-1} se torna mais fraca.

1.6.7 Propriedades morfológicas do amido de pinhão

Os grânulos de amido de diferentes fontes botânicas apresentam tamanho e forma diferenciados. Os amidos normalmente apresentam diâmetro médio que varia entre 7 e 20 μm . São classificados como grandes quanto têm diâmetro maior que 25 μm , médios os que possuem diâmetro entre 10 e 25 μm , pequenos os que possuem entre 5 e 10 μm e bem pequenos os menores que 5 μm . Possuem variadas formas nas quais coexistem grânulos ovais, elipsóides, truncados ou hemisféricos, apresentando superfície lisa, com ou sem irregularidades ou porosidade superficial (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; BENINCA *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2015a, 2015b; RIBEIRO *et al.*, 2014).

O amido de pinhão nativo apresenta uma mistura de grânulos em formato arredondado e ovalado. Possui superfície lisa, sem a presença de poros, mas com algumas depressões (Figura 1.13). Com homogeneidade na distribuição granulométrica, o diâmetro médio varia entre 10 e 25 μm , similar ao de amido de trigo e de milho (BENINCA *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2014; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a).

Figura 1.13 - Microimagens de amido de pinhão nativo obtido por diferentes metodologias



Fonte: Adaptado de: COSTA *et al.* (2013); DAUDT *et al.* (2014)

Nota: (A) Microscopia óptica – 400x; (b) Microscopia óptica com luz polarizada – 40x; (c) Microscopia eletrônica de varredura – 1500x e (d) Microscopia de força atômica - método de não contato

Diversas técnicas podem ser empregadas para visualizar a morfologia e avaliar o tamanho dos grânulos de amido. A microscopia é uma importante ferramenta no estudo das características dos grânulos de amidos, fornece informações sobre a sua origem botânica e pode ser utilizado para examinar alterações nos grânulos resultantes do processo de modificação.

Em geral, todos os grânulos de amido nativos em solução aquosa são birrefringentes e mostram as características do padrão de "cruz de Malta" quando visto microscopicamente sob luz polarizada (Figura 1.13, B), caracterizando a orientação radial das macromoléculas (BENINCA, 2007).

A escolha da técnica e do microscópio para uma visualização de alta resolução da estrutura dos grânulos de amido, é dependente do tipo de informação requerida, ou seja, da superfície ou da estrutura interna (LEONEL, 2007).

Informações sobre a superfície dos grânulos podem ser conseguidas tanto com a microscopia eletrônica de varredura (SEM) ou com a microscopia de força atômica (AFM). A microscopia de força atômica no modo não-contato (NC-AFM) aplicada a análise de amidos possibilita o cálculo da rugosidade média das amostras bem como a determinação dos diâmetros médios dos grânulos, além de permitir a obtenção de imagens da superfície dos grânulos nativo e modificados em alta resolução 2D e 3D (BENINCA *et al.*, 2013a; RIBEIRO *et al.*, 2014).

**CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO DE PINHÃO
A PARTIR DE SEMENTES COLETADAS NA FLORESTA NACIONAL
DE TRÊS BARRAS**

RESUMO

A Floresta Nacional de Três Barras (Flona) é uma área de conservação da Floresta Ombrófila Mista. O pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, apresenta uma amêndoa rica em amido, facilmente extraído e que pode ser aplicado em diversos setores industriais. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar as propriedades térmicas, de pasta, estruturais e morfológicas do amido de pinhão coletado em três talhões distintos (A, B e C) na Flona. As sementes foram coletadas após queda natural da pinha e a massa de cada fração do pinhão (amêndoa, casca e embrião) foi mensurada. A partir da amêndoa obteve-se a farinha, o amido e o bagaço residual deste processo. O rendimento do processo de extração aquosa do amido foi superior a 34 %. O bagaço apresentou teor de carboidratos similar ao da farinha, cujos grânulos de amido remanescentes foram visualizados por microscopia. Três perdas de massa, características para amido, foram observadas por termogravimetria. A estabilidade térmica das amostras foi diferente a depender do ponto de coleta do pinhão, com uma diferença de 40 °C entre as amostras A e C. As temperaturas de pico observadas durante a gelatinização das amostras foram similares às temperaturas de pasta. A amostra C apresentou maior entalpia de gelatinização (8,6 J g⁻¹). O padrão de cristalinidade do amido de pinhão é do tipo-C_A com cristalinidade relativa próxima a 23-24 %. Há escassez de estudos sobre a caracterização de amido de pinhão coletado na Flona de Três Barras.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*. Termogravimetria. Temperatura de gelatinização. Bagaço.

ABSTRACT

The Três Barras National Forest (Flona) is a conservation area of the Mixed Ombrophilous Forest. The pinhão, *Araucaria angustifolia* seed, has a amilaceous almond, easily extracted and that can be applied in various industrial sectors. Thus, the aim of this work is to evaluate the thermal, paste, structural and morphological properties of pinhão starch collected in three distinct plots (A, B and C) in Flona. The seeds were collected after natural fall of the pine cone and the mass of each pinhão fraction (almond, coat and embryo) was measured. From the almond was obtained the flour, starch and residual bagasse from this process. The yield of the aqueous extraction of starch was greater than 34 %. The bagasse presented similar carbohydrate content to the flour, whose remaining starch granules, as visualized by microscopy. Three mass losses, characteristic for starches, were observed by thermogravimetry. The thermal stability of the samples differed depending on the plot where the pinhão was collected, with a difference of 40 °C between samples (A) and (C). Peak temperatures observed during gelatinization of samples were similar to paste temperatures. Sample (C) presented higher gelatinization enthalpy (8.6 J g⁻¹). The crystallinity pattern of pinhão starch was CA-type, and the relative crystallinity was close to 23-24 %. According to the best of our knowledge, this is first study on the characterization of pinhão starch collected in the Flona- Três Barras.

Keywords: *Araucaria angustifolia*. Thermogravimetry. Gelatinization temperature. Bagasse.

2.1 INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), um ecossistema do bioma Mata Atlântica, é caracterizada pela presença da *Araucaria angustifolia*, conhecida popularmente como araucária. A árvore é a única de sua espécie com ocorrência natural no Brasil, predominantemente na Região Sul (ZECHINI *et al.*, 2012).

Originalmente, o estado de Santa Catarina apresentava cerca de 42,5 % do seu território coberto pela FOM (SANT'ANNA, 2011). No entanto, devido a intensa extração madeireira, especialmente entre os anos 1910 e 1970, atualmente não ultrapassa 3 % de sua cobertura original (WILSON *et al.*, 2019). Cerca de 100 milhões de árvores foram derrubadas entre os anos 1930 e 1990. Atualmente, a araucária encontra-se ameaçada de extinção e, por isso, a exploração da sua madeira está proibida no Brasil desde 2001 (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012).

Localizada no Planalto Norte Catarinense, a Floresta Nacional de Três Barras (Flona) é uma Unidade de Conservação Federal de Uso Sustentável. Foi fundada em outubro de 1944 e atualmente está sob gestão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Cerca de 31,4 % do seu território (4458 ha) é área de reflorestamento e de floresta nativa de araucária (GONÇALVES *et al.*, 2016).

A semente da *Araucaria angustifolia*, denominada pinhão, é considerada um importante recurso não-madeirável (ZANETTE *et al.*, 2017). Como forma de colaborar com a preservação da espécie, uma lei de Santa Catarina permite sua coleta e comercialização somente a partir de primeiro de abril (GONÇALVES *et al.*, 2016).

O pinhão apresenta, em base seca, 6,4 % de proteínas, 1 % de lipídeos e 5,20 % de fibra alimentar e 64 % de amido, sendo este o principal componente (JORGE *et al.*, 2018). Sua amêndoa pode ser consumida cozida ou assada e é apreciada também pela fauna silvestre (ZANETTE *et al.*, 2017).

O amido é um polissacarídeo sintetizado pelas plantas a partir da glicose e é acumulado nos amiloplastos em forma de grânulos (AI; JANE, 2015; PREISS, 2004). Industrialmente o amido apresenta uma vasta aplicação sendo utilizado nos setores têxtil, químico, farmacêutico e alimentício (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

As principais fontes para extração do amido são o milho, mandioca, trigo e batata (WATERSCHOOT *et al.*, 2015), no entanto, novas fontes de amido tem sido estudadas (AHMADU *et al.*, 2018; ASCHERI; PEREIRA; BASTOS, 2014; BET *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2015a). A obtenção e caracterização da farinha e do amido de pinhão foram reportadas em

alguns estudos (ACORSI *et al.*, 2009; BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CORDENUNSI *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014, 2016; JORGE *et al.*, 2018; WOSIACKI; CEREDA, 1985).

As propriedades tecnológicas, composição, estrutura molecular e granular do amido variam de acordo com a fonte botânica, origem geográfica (clima e solo), estágio de maturação e atividade enzimática envolvida na biossíntese do amido (AI; JANE, 2015; DENARDIN; SILVA, 2009; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; ZHU, 2015b).

Costa *et al.* (2013) avaliaram quatro amostras de amido de pinhão oriundo do banco de germoplasma da Embrapa Floresta (Colombo, PR), o qual possui grupos de genótipos representativos com variabilidade genética de espécies objeto de conservação. De acordo com os autores, as diferenças observadas nas propriedades térmicas e de pasta do amido não eram esperadas uma vez que se trata de pinhão coletado no mesmo local, período e condições.

Zortéa-Guidolin *et al.* (2017) verificaram diferença significativa nas propriedades estruturais e funcionais de amido de pinhão coletados em sete diferentes acessos deste mesmo banco de germoplasma. A coleta das sementes completamente maduras foi realizada em diferentes períodos (precoce - março ou médio - maio). Os resultados apontaram diferença em algumas das propriedades dos amidos, estando mais relacionadas ao local do que ao período de coleta.

Muitas pesquisas sobre a *Araucaria angustifolia* foram realizados na Flona de Três Barras, principalmente voltadas a área de recursos genéticos (GONÇALVES *et al.*, 2016). Não foram encontrados dados relacionados à obtenção e caracterização do amido de pinhão oriundo desta Unidade de Conservação. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar as propriedades térmicas, de pasta, estruturais e morfológicas do amido de pinhão coletado na Floresta Nacional de Três Barras.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas no Planalto Norte de Santa Catarina, na Floresta Nacional de Três Barras (Flona - localizada a 26°12'39.6"S e 50°18'52.2"W). Por se tratar de uma Unidade de Conservação, foi necessário submeter um projeto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente – MMA. Após a aprovação do projeto, obteve-se a Autorização para Atividades com Finalidade

Científica nº53789-1 (anexo A). O documento permite a coleta e transporte de material biológico, em quantidade e época diferenciadas daquelas estabelecidas por normas estaduais (Lei nº 15.457 de 17 de janeiro de 2011) e internas da Flona.

Os pontos de coleta (talhões) foram definidos de acordo com os mapas da Flona levando-se em consideração a acessibilidade ao local no momento da coleta.

Os pinhões foram coletados em 2016 após queda natural da pinha, ou seja, após completa maturação, nos três pontos (A, B, C) conforme mapa (anexo B). Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos dispostos em caixa térmica (sem refrigeração). A caixa foi imediatamente transportada para os laboratórios do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os pinhões foram armazenados sob refrigeração (8 °C) por 5 dias, até a realização das etapas posteriores.

2.2.2 Obtenção do amido de pinhão

O amido de pinhão foi obtido por processo aquoso, conforme demonstrado na Figura 2.1. Para isso, o pinhão foi cortado longitudinalmente com auxílio de faca descascadora de pinhão. A casca, a película e o embrião foram manualmente removidos.

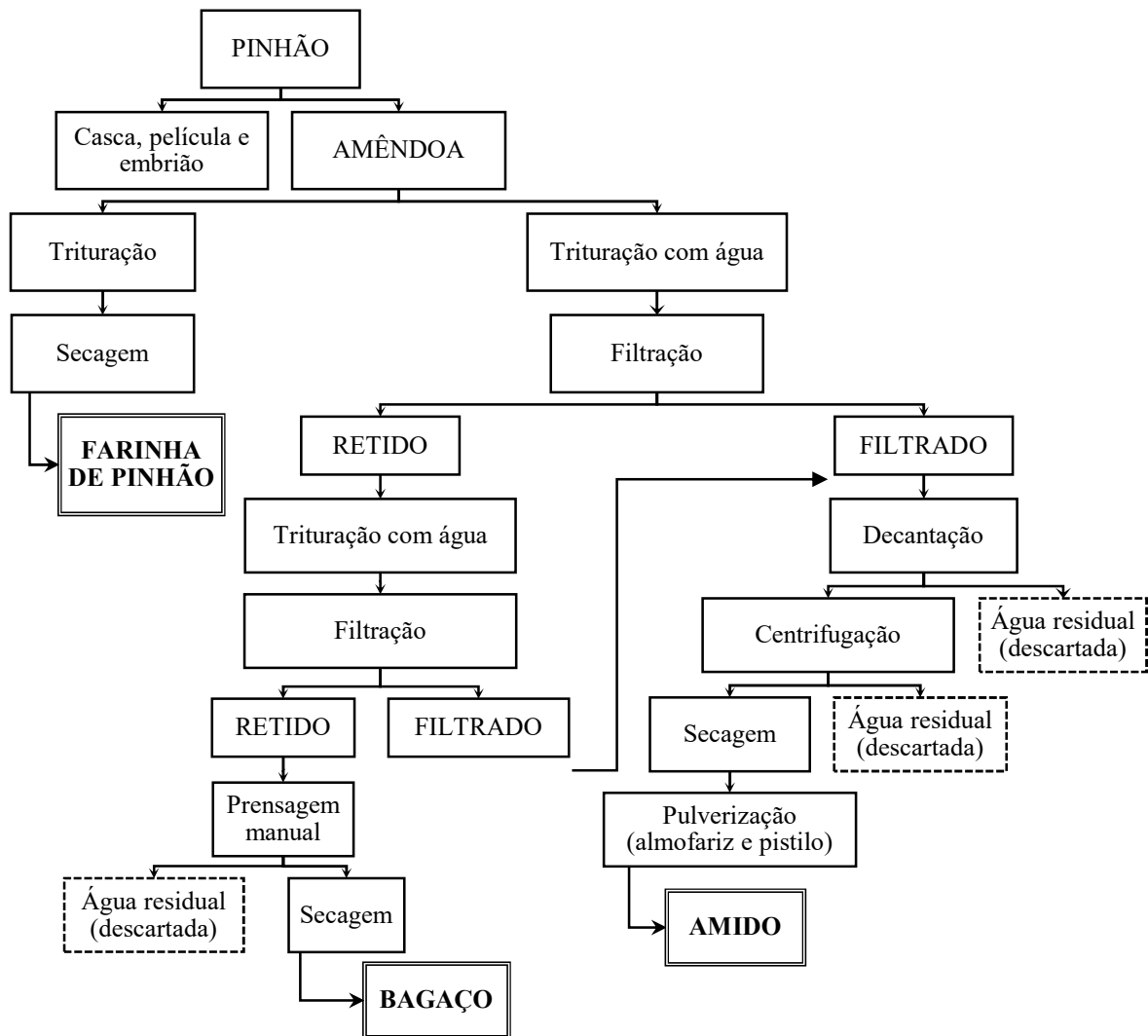
A partir da obtenção da amêndoa fresca descascada e sem embrião, foram realizados dois processos. No primeiro, uma parte de amêndoas foi separada, triturada em liquidificador por 5 minutos e seca em estufa a 40 °C por 24 horas. Esta fração foi denominada farinha de pinhão (FAR).

No segundo processo, as amêndoas foram trituradas com água na proporção 1:2 (m/v) em liquidificador por 5 minutos, seguido por filtração (peneiras de 60 e 270 mesh, respectivamente). Deste processo foram obtidas duas frações: (1) o material retido - bagaço, e (2) o filtrado - suspensão de amido em água.

O bagaço foi ressuspenso em água (1:2 m/v), submetido a nova trituração e filtração (270 mesh). O excesso de água foi removido por prensagem manual. A suspensão (filtrado) foi misturada a obtida no processo anterior. Este bagaço residual do processo de extração do amido foi seco em estufa a 40 °C por 24 horas.

Para remoção do excesso de água, a suspensão permaneceu em repouso por 6 h (4 °C). O decantado foi centrifugado a 8600 x g (Himac CR21GII, Hitachi) durante 10 minutos a 4 °C. O amido resultante foi seco em estufa com circulação de ar forçada (40 °C por 12 h) e então pulverizado em almofariz com pistilo. Após, foi armazenado em dessecador com cloreto de cálcio anidro até a execução das análises.

Figura 2.1 – Fluxograma da extração aquosa do amido de pinhão



2.2.3 Determinação do comprimento e massa dos pinhões

O comprimento de cada um dos pinhões foi medido com auxílio de um paquímetro antes do descascamento. Após esta etapa, para cada ponto de coleta, as cascas, películas, amêndoas e embriões foram pesados.

2.2.4 Cálculo do rendimento do processo de extração de amido

Os produtos resultantes da extração aquosa do amido (farinha, bagaço e amido) foram pesados após a secagem. O rendimento do processo, em porcentagem, foi calculado com base na massa inicial de pinhão descascado (100 %).

2.2.5 Composição proximal

A farinha e o bagaço residual obtidos a partir da extração do amido do pinhão foram submetidos a análise de composição proximal. Seguindo metodologias descritas pela AOAC (2000), foram determinados o teor de umidade (935.29) em estufa a 105 °C, cinzas (923.03) por incineração a 550 °C, lipídeos (920.85) pelo método de extração com Soxhlet, proteínas (960.52) pelo método de Kjeldahl (fator de conversão N*6,25, conforme Bello-Pérez *et al.* (2006)) e de fibra alimentar (985.29). O teor de carboidratos foi calculado por diferença.

2.2.6 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

O equipamento TGA-50 (Shimadzu, Japão) foi utilizado para obtenção das curvas termogravimétricas. Cerca de 7 mg de amido foram pesadas em cadinhos de alfa-alumina. A análise foi realizada nas seguintes condições: cadinho aberto; atmosfera de ar sintético a uma vazão de 150 mL min⁻¹; razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 650 °C. O software TA-60 foi utilizado para gerar a curva DTG e auxiliar na obtenção das temperaturas envolvidas em cada evento térmico (BET *et al.*, 2016).

2.2.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento DSC Q-200 (TA Instruments, EUA) previamente calibrado de acordo com as normas do fabricante, e aferido com padrão de índio puro (99,99 %). Aproximadamente 2,5 mg de amido foram pesados em cadinho de alumínio ao qual foi adicionado água para obtenção de uma suspensão 1:4 (amido:água, m/v). O cadinho foi tampado e selado. As demais condições de análise foram as seguintes: atmosfera de ar sintético a uma vazão de 50 mL min⁻¹; razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 100 °C. Para obter as temperaturas e entalpia de gelatinização foi utilizado o programa Universal Analysis 2000 (CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015).

2.2.8 Propriedades de pasta (RVA)

Equipamento RVA-4 (Newport Scientific, Austrália) foi utilizado para avaliação das propriedades de pasta das amostras. Para isso, uma dispersão de 28 g de amido em água (8 %, m/m) em base seca foi preparada e submetida a um ciclo de aquecimento e resfriamento controlado sob agitação circular constante (COSTA *et al.*, 2013). Para esta análise, a umidade das amostras foi verificada por termogravimetria.

2.2.9 Difractometria de raios X pelo método de pó (DRX)

Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku, Japão), empregando-se radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,541 \text{ \AA}$), a uma tensão de 40 kV e corrente de 20 mA. A radiação dispersa foi detectada em um intervalo angular de 3° a 40° (2θ), com velocidade de escaneamento de 2° min^{-1} , e um passo de $0,06^\circ$. A cristalinidade relativa (CR) foi calculada seguindo a equação 3 (NARA; KOMIYA, 1983):

$$CR (\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad (3)$$

onde A_c é a área cristalina e A_a é a área amorfa no difratograma de raios X.

2.2.10 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

O diâmetro e a forma dos grânulos de amido serão observados em microscópio eletrônico de emissão de campo MIRA 3 (Tescan, República Tcheca) com uma corrente do feixe de elétrons de 15 kV no canhão de emissão de campo, gerada por uma lâmpada com filamento de tungstênio, após metalização da amostra (20 mA, 150 s) para promover a passagem de elétrons. A imagem foi gerada por elétrons secundários (SE) (BENINCA *et al.*, 2019).

2.2.11 Análise Estatística

Parar as análises realizadas em triplicata, foi assumida a normalidade dos dados. O teste de Levene foi aplicado para avaliar a homocedasticidade das variâncias. Para verificar se as amostras diferiam entre si, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e, no caso de diferenças, a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). O software Action Stat versão 3.3 (Estatcamp, São Paulo, Brasil) foi utilizado para este fim.

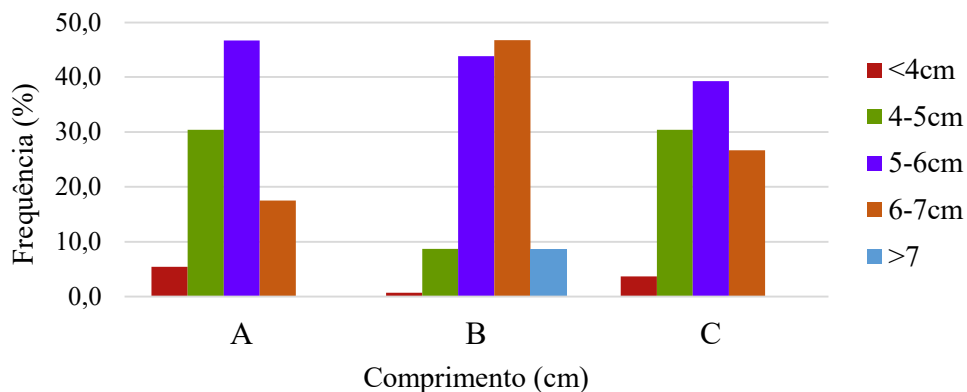
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Comprimento e massa dos pinhões

Para esta pesquisa, foram coletados 652 pinhões na Flona no ano de 2016, sendo 240 no talhão A, 276 no talhão B e 135 no talhão C. A maior frequência de distribuição de comprimento ocorreu na faixa de 5 a 6 cm (Figura 2.2). A amostra B apresentou os maiores pinhões com mais de 90 % deles entre 5 a 7 cm, sendo a única que apresentou pinhões $> 7 \text{ cm}$.

Em relação às demais, a amostra A apresentou maior frequência de pinhões <4 cm. A distribuição mais homogênea de comprimento foi obtida para a amostra C, com 96,3 % dos pinhões coletados medindo entre 4 e 7 cm.

Figura 2.2 – Distribuição de comprimento dos pinhões coletados na Flona



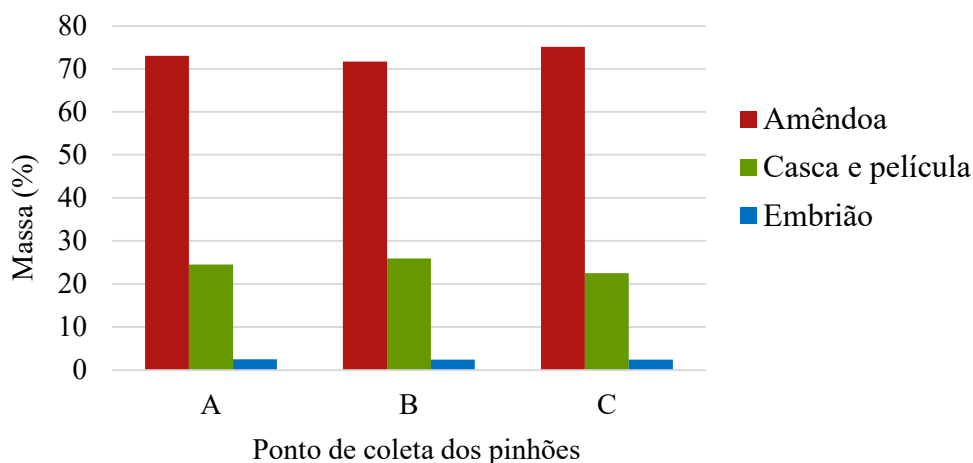
Nota: Amostras coletadas nos talhões A ($n=240$), B ($n=276$) e C ($n=135$), onde n é o número de pinhões.

É importante ressaltar que os pinhões foram coletados após queda natural da pinha e, por isso, a distribuição dos comprimentos é ao acaso. Shibata (2013) reportou que o tamanho dos pinhões pode variar entre 1,7 a 8 cm de comprimento e a variação entre eles é menor quando se trata da coleta de uma mesma pinha pois os pinhões de cada estróbilo apresentam massa e tamanho semelhantes.

O tamanho dos pinhões também é influenciado pelo estágio de maturação das sementes. Shibata; Coelho e Steiner (2013) coletaram pinhas em quatro diferentes estágios de desenvolvimento. O tamanho médio dos pinhões foi similar entre os estágios I-II com tamanho médio de 5,6 e 5,3 cm, e entre os estágios III-IV com 4,7 e 4,9 cm, respectivamente. Segundo os autores, a redução do tamanho está relacionada com o início do processo de secagem por maturação, que ocorre no último estágio do desenvolvimento das sementes.

O pinhão compreende quatro frações: casca, película, embrião e amêndoa, sendo esta a fração de interesse para obtenção do amido (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006). Com o intuito de se obter amido com menor teor possível de resíduos, a película deve ser removida manualmente da amêndoa (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; WOSIACKI; CEREDA, 1985). Como grande parte da película fica aderida à casca após o descascamento, estas duas frações (casca e película) foram pesadas concomitantemente e os resultados (em porcentagem) estão apresentados na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Massa (%) de cada fração dos pinhões coletados na Flona



Nota: Amostras coletadas nos talhões A ($n=240$), B ($n=276$) e C ($n=135$), onde n é o número de pinhões.

Em média, a amêndoa fresca representou 73,3 % da massa dos pinhões e 24,3 % corresponde à massa da casca (externa e película interna). O embrião, com cerca de 2,5 % da massa dos pinhões, foi a fração que mostrou menor variação entre os pontos de coleta.

Estes dados estão de acordo com os obtidos por Bello-Pérez *et al.* (2006) e Cordenunsi *et al.* (2004), cujos pinhões variaram entre 7 e 9 gramas, sendo que a casca representou aproximadamente 22 % da sua massa.

2.3.2 Rendimento do processo de extração de amido

O amido de pinhão pode ser extraído diretamente a partir da amêndoa fresca descascada (CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2014; HORNUNG *et al.*, 2019), ou após obtenção da farinha (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014; HENRÍQUEZ *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2014), sendo o bagaço um coproduto deste processo.

No primeiro processo, obteve-se a farinha de pinhão a partir da trituração e secagem da amêndoa fresca. Em média, a massa final da farinha correspondeu a aproximadamente 57 % da massa da amêndoa fresca. Já no processo de extração de amido, a cada 100 g de amêndoa fresca descascada submetida ao processo de extração aquosa do amido, obteve-se 34,3 g de amido e 12,5 g de bagaço secos. Estes resultados demonstram rendimento de amido similar aos obtidos por Cordenunsi *et al.* (2004) e Thys *et al.* (2010). Jorge *et al.* (2018) obtiveram rendimento de 63,8% de amido em base seca a partir da farinha de pinhão.

A trituração em água é essencial para que se obtenha um bom rendimento do processo de extração de amido (BET *et al.*, 2019). Bello-Pérez *et al.* (2006) afirmam que a metodologia empregada para extração do amido de pinhão é simples e oferece um alto rendimento, características interessantes para produção em escala comercial.

2.3.3 Composição proximal da farinha e do bagaço

Com umidade entre 6 e 8 %, a farinha de pinhão apresentou aproximadamente 5 % de proteínas e um baixo teor de lipídeos e cinzas (Tabela 2.1). O bagaço, fração sólida residual obtida do processo de obtenção do amido de pinhão, apresentou composição próxima à da própria semente, no entanto observa-se maior concentração de fibras.

Tabela 2.1 – Composição proximal (g 100g⁻¹) da farinha de pinhão e do bagaço residual do processo de extração de amido

Amostra	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	Fibra alimentar	Carboidratos
Farinhas						
(A)	8,44 ±0,01 ^a	5,17 ±0,08 ^c	1,93 ±0,26 ^{ab}	0,66 ±0,00 ^e	6,74 ±0,03 ^b	77,06 ±0,36 ^b
(B)	6,73 ±0,08 ^b	5,49 ±0,00 ^b	2,21 ±0,07 ^a	2,99 ±0,05 ^a	6,35 ±0,05 ^c	76,23 ±0,22 ^c
(C)	8,43 ±0,35 ^a	5,67 ±0,08 ^b	1,76 ±0,03 ^b	2,55 ±0,02 ^b	5,97 ±0,05 ^d	75,63 ±0,26 ^c
Bagaços						
(A)	6,09 ±0,11 ^c	6,01 ±0,12 ^a	0,68 ±0,10 ^d	2,47 ±0,02 ^c	8,49 ±0,10 ^a	76,26 ±0,20 ^c
(B)	7,14 ±0,21 ^b	4,74 ±0,05 ^d	0,73 ±0,1 ^d	1,04 ±0,01 ^d	8,42 ±0,05 ^a	77,94 ±0,09 ^a
(C)	7,25 ±0,32 ^b	4,85 ±0,15 ^d	1,30 ±0,06 ^c	0,72 ±0,02 ^e	8,40 ±0,09 ^a	77,49 ±0,33 ^{ab}

^{a,b,c} Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)
Farinhas e bagaços oriundos do processamento dos pinhões dos talhões A, B e C.

De acordo com a Legislação Nacional vigente (BRASIL, 2012) um alimento é considerado “rico” ou com alto teor de fibras quando apresenta mais que 6g de fibra por 100g de produto. Assim, a farinha de pinhão e o bagaço residual obtido da extração do amido de pinhão podem ser enquadradas nesta categoria, o que pode agregar valor comercial ao produto. É importante ressaltar que, quando aplicados como ingrediente na formulação de alimentos, o teor de fibras do produto final deverá ser avaliado para fins de rotulagem e alegação de propriedades nutricionais.

De uma forma geral, o teor de proteínas e lipídeos foi menor no bagaço que na farinha de amido. É possível que estas frações tenham permanecido na água residual, que foi descartada. Segundo Bet *et al.* (2019), durante o processo de extração, o amido forma uma suspensão com água fria e apresenta aspecto leitoso. O uso da água, agitação e filtração em peneira colaboram para a remoção de proteínas e fibras do amido, e a centrifugação visa a

separação de proteínas e lipídeos. Por microscopia, verificaram que parte das fibras e proteínas ficaram aderidas ao amido, o que não foi observado no presente estudo (Figura 2.7).

Estudos com bagaço de mandioca (FARIAS *et al.*, 2014) e amaranto (BET *et al.*, 2019) apontam que o teor de carboidratos é similar ao das farinhas, pois parte do amido fica preso entre as fibras. Para remover este amido e aumentar o rendimento do processo de extração de amido, seria necessário realizar inúmeras vezes a triturações do bagaço (BET *et al.*, 2019), no entanto isso aumentaria a quantidade de água residual. Outro método sugerido é a aplicação de ultrassom ao bagaço, pois a cavitação provoca perturbação nas células vegetais facilitando a liberação dos componentes celulares, como o amido (BERNARDO; ASCHERI; CARVALHO, 2016; MASON; PANIWNKY, 1996).

Além de ser utilizada na gastronomia (GODOY *et al.*, 2013), a farinha de pinhão foi estudada como matéria-prima para a produção de biscoitos com substituição de 5 %, 10% e 20% da farinha de trigo. Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para o índice de aceitação das amostras, mas aquela com 10% de farinha de pinhão foi considerada com melhor aroma e sabor pelos provadores (ACORSI *et al.*, 2009).

A amêndoa triturada em água para obtenção de uma massa homogênea foi empregada para a produção de pães sem glúten, foi considerada uma interessante alternativa para pacientes celíacos. As formulações com amêndoa de pinhão e amido de batata e outra, com os mesmos ingredientes mais a farinha de arroz, apresentaram resultados físico-químicos e sensoriais mais positivos em relação à formulação elaborada com amido de batata e trigo sarraceno (POLET *et al.*, 2019).

A farinha de pinhão cru ou cozido e o pinhão triturado semi desidratado foram utilizados para a elaboração de quatro formulações de uma mistura pré-pronta para o preparo de suflê. Em relação à cor, a farinha de pinhão cru foi mais aceita, mas a obtida com pinhão cozido foi a que apresentou *flavor* característico sendo mais aceita sensorialmente. O emprego do pinhão triturado é uma alternativa interessante, mas não necessária, uma vez que sua presença não afetou a aceitação global do suflê (CLADERA-OLIVERA, 2008).

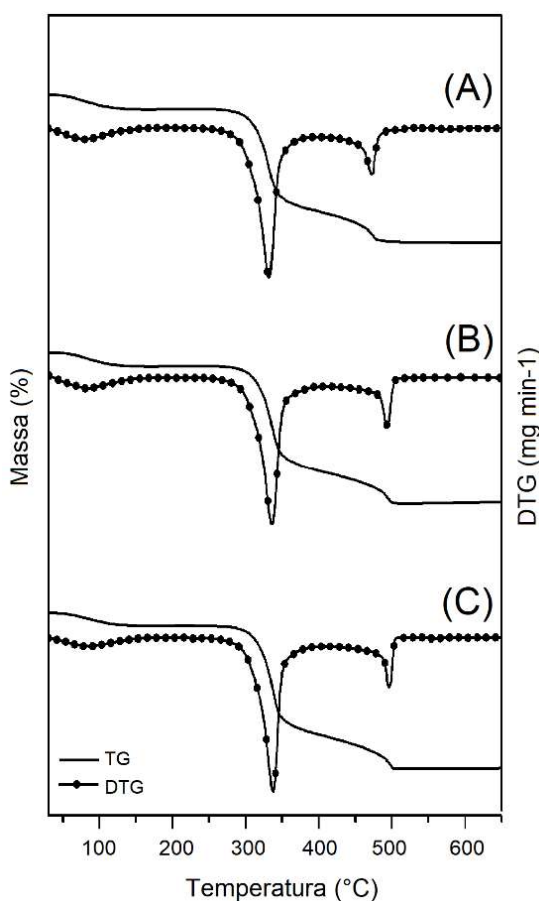
As farinhas de pinhão cru, cozido e pré-gelatinizado foram avaliadas como adjunto para produção de cerveja. Embora não tenha contribuído com aporte enzimático, quando a farinha de pinhão pré-gelatinizado foi empregada numa proporção de 20% e 80% de malte de cevada, o rendimento do processo aumentou em 10% e colaborou com a filtrabilidade e a estabilidade coloidal da cerveja, sem perturbar os parâmetros físico-químicos (pH, cor, aroma e tempo de conversão enzimática). Para proporções maiores que 20% faz-se necessária a adição de enzimas para evitar perdas de rendimento e problemas tecnológicos. A pré-gelatinização foi

considerada um método simples e barato, sem necessidade de emprego de agentes químicos ou pré-tratamento, tornando-se viável para produção de cerveja em escala piloto e comercial (JORGE *et al.*, 2018). Não foram encontrados relatos sobre a aplicação do bagaço no desenvolvimento de produtos.

2.3.4 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

A análise termogravimétrica é comumente utilizada para avaliar a estabilidade térmica de amido (LIU *et al.*, 2019). Os amidos de pinhão apresentaram uma curva TG característica para amidos nativos, com três perdas de massa e um período de estabilidade entre a primeira e segunda perda (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Curvas TG/DTG dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona



A primeira perda de massa refere-se à desidratação, e a segunda e terceira perdas de massa referem-se a decomposição e oxidação da matéria orgânica (BET *et al.*, 2018b; OLIVEIRA *et al.*, 2018b).

Os resultados obtidos através das curvas TG/DTG são similares para as três amostras avaliadas (Tabela 2.2). A umidade das amostras variou entre 8 e 10 %. De acordo com Thys *et al.* (2010), a umidade de equilíbrio do amido de pinhão varia de acordo com a temperatura e situa-se entre 7 e 10 % a depender do modelo matemático empregado para a sua avaliação.

Tabela 2.2 – Resultados TG/DTG dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona

Amostra	Evento	1ª perda	estabilidade	2ª perda	3ª perda
CAN	Δm (%)	7,9	-	71,0	17,8
	Ti-Tf (°C)	30 - 114	114 - 291	291 - 414	414 - 564
	ΔT (°C)	84	178	124	151
NAT	Δm (%)	9,7	-	66,2	21,9
	Ti-Tf (°C)	30 - 117	117 - 272	272 - 344	344 - 482
	ΔT (°C)	87	156	73	139
T7	Δm (%)	8,7	-	68,4	19,7
	Ti-Tf (°C)	30 - 158	158 - 252	252 - 411	411 - 517
	ΔT (°C)	128	95	160	107

Δm = perda de massa; Ti - Tf = temperatura inicial e final do evento térmico; ΔT = intervalo de temperatura (Tf-Ti) no evento térmico, E = estabilidade térmica (sem variação de massa)

A estabilidade térmica é um período em que a variação de massa é considerada desprezível. A amostra (C) apresentou maior capacidade de retenção de umidade durante a análise TG uma vez que a temperatura inicial da estabilidade térmica é 40 °C maior que as demais amostras. Já a temperatura final observada no período de estabilidade desta amostra é 20 °C e 40 °C menor que as observadas para as amostras (B) e (A), respectivamente.

Observa-se que a perda de massa na etapa de decomposição é maior que na de oxidação, corroborando com dados reportados por outros autores (BICUDO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2019; SINGH; NATH, 2012).

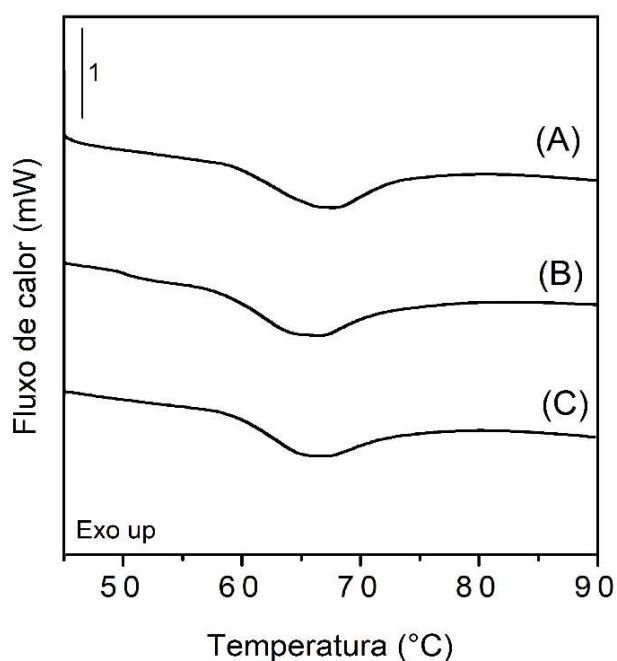
O teor de cinzas, ou seja, a massa residual da análise termogravimétrica a 650 °C, foi de aproximadamente 3,2 % para as amostras (A) e (C) e 2,2 % para a amostra (B).

2.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os grânulos de amido nativo não são solúveis em água fria, sendo necessário promover sua gelatinização na maioria das aplicações (CARLSTEDT *et al.*, 2015). A gelatinização é um fenômeno endotérmico que necessita de água suficiente a uma dada temperatura para que seja promovida transformação da estrutura ordenada (semicristalina) do amido para um estado amorfo (AI; JANE, 2015).

Assim, a temperatura e energia necessárias para a gelatinização do amido são informações importantes para o processamento e preparo de alimentos (LELIÈVRE; LIU, 1994). As curvas resultantes da análise DSC para os amidos de pinhão estão apresentadas na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Curva DSC dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona



Conforme resultados apresentados na Tabela 2.3, a temperatura de gelatinização (T_p) do amido de pinhão encontra-se ao redor de 65 °C, sendo ligeiramente maior para as amostras (A) e (C). Já a entalpia envolvida no processo foi maior para a amostra (C).

Tabela 2.3 – Temperatura e entalpia de gelatinização dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona

Amostra	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔT (°C)	ΔH_{gel} (J g ⁻¹)
(A)	59,70 ± 0,08 ^a	66,62 ± 0,10 ^a	73,42 ± 0,13 ^a	13,72 ± 0,07 ^a	6,83 ± 0,05 ^b
(B)	58,91 ± 0,32 ^b	64,62 ± 0,13 ^b	71,13 ± 0,19 ^b	12,22 ± 0,45 ^b	7,28 ± 0,09 ^b
(C)	59,59 ± 0,20 ^a	66,51 ± 0,09 ^a	68,47 ± 0,01 ^c	8,88 ± 0,21 ^c	8,61 ± 0,40 ^a

T_o = temperatura inicial (onset); T_p = temperatura de pico; T_c = temperatura de conclusão, $\Delta T = T_c - T_o$; ΔH_{gel} = entalpia de gelatinização

Costa *et al.* (2013) também verificaram variações estatísticas entre os resultados de quatro amostras obtidas no mesmo banco de germoplasma, e com isso sugerem que as amostras podem ser de diferentes origens genéticas. Os autores constataram duas amostras que

apresentam T_p menor que 60 °C, sendo que uma delas apresenta T_p igual a 50,3 °C, valores considerados baixos em relação a outros trabalhos com amido de pinhão.

Resultados similares de temperaturas de gelatinização foram obtidos por (ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a). No entanto, a energia requerida para o processo neste trabalho foi cerca de 50 % menor que as verificadas pelos autores.

Inúmeros fatores podem afetar os resultados da calorimetria exploratória diferencial, tais como condições empregadas no preparo da amostra e na análise (BICUDO *et al.*, 2009; IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014), e as características intrínsecas da amostra, como a proporção amilose/amilopectina, composição (conteúdo de fósforo, lipídeos, proteínas), estrutura molecular da amilopectina, morfologia e tamanho dos grânulos (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007).

2.3.6 Propriedades de pasta (RVA)

O visco-analisador rápido (RVA) é amplamente utilizado para avaliar as propriedades de pasta de amido quando submetidos ao cisalhamento em aquecimento e resfriamento controlados (SORBA; SOPADE, 2013). Os resultados desta análise para os amidos de pinhão estão apresentados na Tabela 2.4

Tabela 2.4 – Resultados da viscoamilografia dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões na Flona

Amostra	Temperatura de pasta (°C)	Tempo de pico (s)	Viscosidade de pico (mPa s)	<i>Breakdown</i> (mPa s)	<i>Setback</i> (mPa s)	Viscosidade final (mPa s)
(A)	64,35	587	3025	1475	1612	3162
(B)	66,30	567	2968	1608	1388	2748
(C)	66,25	573	3022	1777	1391	2636

Durante o aquecimento, a suspensão tem sua viscosidade aumentada devido ao início do intumescimento dos grânulos até atingir uma viscosidade máxima. A viscosidade de pico reflete a capacidade dos grânulos de inchar antes de seu colapso físico. Os amidos que incham com mais facilidade são menos resistentes ao cisalhamento durante cozimento e, portanto, exibem um baixo *breakdown* (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007).

As amostras (B) e (C) apresentaram valores similares de temperatura de pasta. A amostra (A) apresentou menor temperatura de pasta e *breakdown* e maiores valores de *setback* e viscosidade final. A viscosidade de pico foi similar entre as três amostras.

O aumento da viscosidade durante o resfriamento é indicativo não apenas da relação inversa normal entre a viscosidade e a temperatura das suspensões, mas também da tendência dos vários constituintes presentes na pasta quente (grânulos inchados, fragmentos de grânulos inchados, e moléculas de amido coloidalmente dispersas e dissolvidas) em se associar ou retrogradar com a gradativa redução de temperatura (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007).

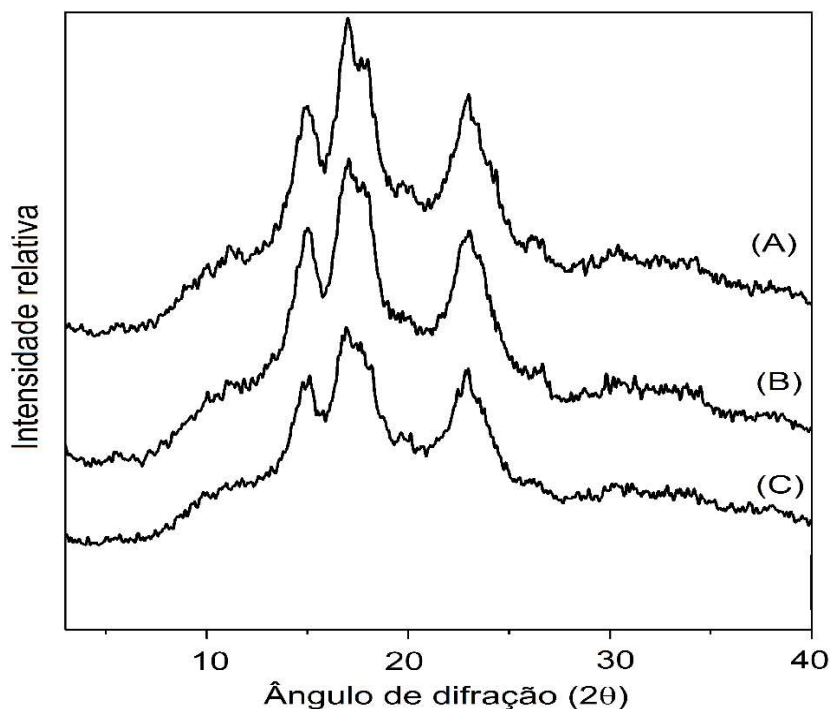
Os valores observados para a temperatura de pasta das três amostras são similares a temperatura de pico obtidas por DSC (Tabela 2.3).

2.3.7 Difratometria de raios X pelo método de pó (DRX)

O padrão de cristalinidade dos amidos de pinhão e sua cristalinidade relativa foram avaliados pelos difratogramas, cujo resultado está apresentado na Figura 2.6.

Para todas as amostras foram observados picos singlete ao redor de 15° , 17° e 23° , com um ombro em 18° , e pequenos picos próximos a $5,6^\circ$, característicos de um amido tipo- C_A (CAI *et al.*, 2014).

Figura 2.6 – Difratogramas dos amidos de pinhão coletados em diferentes talhões da Flona

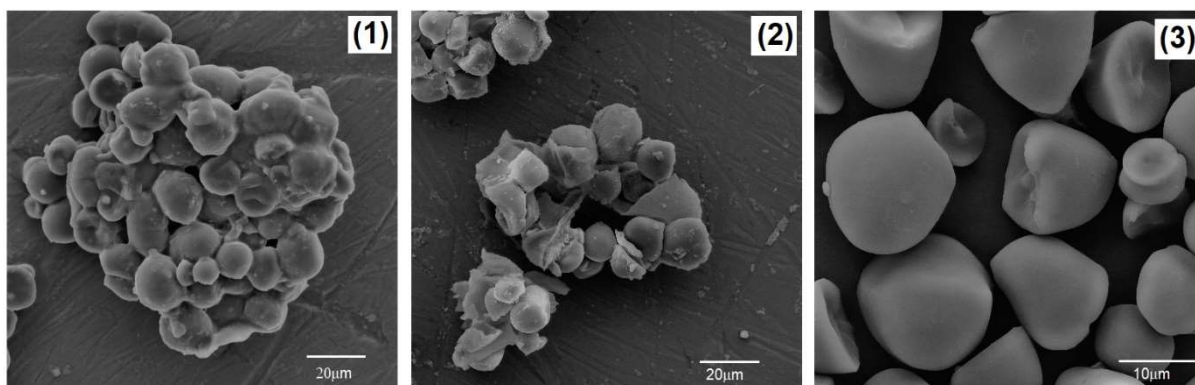


A cristalinidade relativa calculada para as amostras (A) foi de 24,2 % e para as amostras (B) e (C) foi de 24,8 % e 23,2 %, respectivamente, sendo menor que os valores observados por Costa *et al.* (2013) e Zortéa-Guidolin *et al.* (2017).

2.3.8 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

De acordo com as microimagens (Figura 2.7) percebe-se o amido como sendo o maior constituinte na farinha e no bagaço de pinhão. A farinha apresenta os grânulos de amido agregados com outras partículas. O mesmo ocorre com o bagaço, no entanto alguns grânulos estão aparentemente mais livres, possivelmente devido a remoção de grande parte destes constituintes no processo de extração aquosa.

Figura 2.7 – Microimagens dos produtos resultantes do processamento do pinhão



Nota: (1) Farinha de pinhão (1000x); (2) Bagaço residual do processo de extração do amido (1000x) e (3) Amido de pinhão (2000x).

Essas informações corroboram com os dados de composição proximal apresentados na Tabela 2.1, especialmente quando se observa que os grânulos de amido não foram totalmente extraídos no processo. Bet *et al.* (2019) tiveram resultados similares, nos quais as proteínas, fibras e lipídeos formavam aglomerados com o amido.

O amido de pinhão apresenta superfície lisa, em formato arredondado e ovalado, com grânulos variando entre aproximadamente 10 e 20 µm, sendo este o padrão observado por outros autores (COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2014; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a). Não houve diferença nos resultados entre as amostras coletadas em diferentes talhões da Flona (dados não mostrados).

A presença de amido no bagaço pode favorecer sua aplicação, pois carrega consigo um constituinte capaz de gerar viscosidade em alimentos, impactando sua textura. Por outro lado, aplicar técnicas que promovam a extração do amido aderido pode aumentar o rendimento do processo base. No entanto, mesmo que se mantenha o processo aquoso, possivelmente envolveria mais custos e geração de resíduos.

2.4 CONCLUSÃO

O amido de pinhão foi facilmente extraído da amêndoa por processo aquoso apresentando um bom rendimento. No entanto, o bagaço apresentou alto teor de carboidratos.

A farinha e o bagaço podem ser enquadradas de acordo com a legislação vigente como rica em fibras. No entanto, se aplicados para o desenvolvimento de produtos alimentícios, é necessário verificar o seu teor no produto final.

A estabilidade térmica foi diferente entre as amostras, sendo menor para o amido cuja semente foi coletada no talhão A.

As temperaturas envolvidas na gelatinização da amostra (A) foram menores que a das demais amostras, enquanto o maior valor de ΔH_{gel} ($8,61 \text{ J g}^{-1}$) foi observado para a amostra (C).

Não houve diferença na viscosidade de pico dos amidos cujas sementes foram coletadas em diferentes talhões da Flona, no entanto a amostra (A) apresentou-se distinta em relação aos demais parâmetros observados por RVA.

Os amidos de pinhão apresentaram padrão tipo- C_A e a cristalinidade relativa variou de 23,2 % para a amostra (C) e 24,8 % para a amostra (B).

As informações obtidas são de fundamental importância ao considerar o amido de pinhão como um possível componente de um produto alimentício.

As diferenças encontradas podem ser consideradas normais para aplicação industrial pois, por se tratar de um produto natural, é comum serem observadas pequenas variações não implicando em danos para o processamento e qualidade do produto final.

**CAPÍTULO 3 - AMIDOS DE MILHO E PINHÃO MODIFICADOS COM
TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO: PROPRIEDADES TÉRMICAS, DE PASTA,
ESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS**

O conteúdo deste capítulo está publicado na revista *Starch/Stärke*:

**Corn and *Pinhão* Starches Modified with Sodium Tripolyphosphate:
Thermal, Pasting, Structural and Morphological Properties**

Cleoci Beninca, Raíssa A. Barboza, Cristina S. de Oliveira, Camila D. Bet,
Radla Z. B. Bisinella, and Egon Schnitzler

(DOI: 10.1002/star.201800290)

RESUMO

Os amidos de pinhão e milho foram submetidos à fosfatação com tripolifosfato de sódio e suas propriedades foram avaliadas por termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial, viscoamilografia, difratometria de raios X pelo método do pó e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo. O processo de fosfatação foi dividido em três etapas para analisar o comportamento da amostra durante exposição aos grupos fosfato. Após a modificação, houve um decréscimo nas temperaturas de gelatinização e entalpia para ambos os amidos. Durante as três etapas de fosfatação, pequenas diferenças foram observadas na estabilidade térmica das amostras, mas um menor valor foi obtido para o amido de milho após a terceira etapa. O decréscimo na temperatura de pasta foi acompanhado por um aumento na viscosidade de pico das suspensões de amidos, no entanto maiores valores de *setback* e *breakdown* foram observadas. O grau de cristalinidade relativa dos amidos fosfatados aumentou e, a partir da microscopia, foi possível observar a presença de cristais de tripolifosfato de sódio durante as etapas de fosfatação.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*; Amido fosfatado; Análise térmica.

ABSTRACT

Pinhão and corn starches were submitted to phosphating with sodium tripolyphosphate and their properties were evaluated by thermogravimetry, differential scanning calorimetry, viscoamylography, X-ray powder diffractometry, field emission gun-scanning electron microscopy analysis. The phosphating process was divided into three steps to analyse the behaviour of the sample on exposure to phosphate groups. After the modification, there was a decrease in the transition temperatures and gelatinisation enthalpy of both starches. During the three phases of phosphating, small differences were observed in the thermal stability of the modified samples, but a lower value was obtained for corn starch after the third stage. The decrease in pasting temperature was accompanied by an increase in the peak viscosity of the starch suspensions, however, higher values for *setback* and *breakdown* were also recorded. The degree of relative crystallinity of the phosphated starches increased, and from microscopy it was possible to observe the presence of crystals of sodium tripolyphosphate during phosphating process.

Keywords: *Araucaria angustifolia*; Phosphate starch; Thermal analysis.

3.1 INTRODUÇÃO

O amido é amplamente aplicado como um ingrediente nas indústrias de alimentos, químicas, farmacêuticas e de papel, sendo principalmente extraído de milho, mandioca, trigo e batata (WATERSCHOOT *et al.*, 2015). Muitos estudos têm sido realizados para encontrar novas fontes de amido não-convencionais que apresentem características de interesse industrial. As sementes do pinhão (*Araucaria angustifolia*) apresentam aproximadamente 70 % de amido (em base seca), facilmente extraído da polpa por processos aquosos, fatores que o tornam atrativo para processamento em planta piloto e em escala comercial (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a).

O amido é composto por dois diferentes polímeros de glucose: amilose e amilopectina (AI; JANE, 2015; PINTO *et al.*, 2015b; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; SINGH *et al.*, 2003). Além disso, podem ser encontrados lipídeos, minerais e compostos nitrogenados, os quais influenciam as características do amido (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). Dentre os minerais, o fósforo parece ser aquele que causa maior influência nas propriedades tecnológicas do amido (WOSIACKI; CEREDA, 1985).

O amido de algumas fontes botânicas naturalmente possui conteúdo de fósforo (BLENNOW *et al.*, 2002; STAHL *et al.*, 2007; WOSIACKI; CEREDA, 1985). Entretanto, grupos fosfato podem ser ligados covalentemente a moléculas de amilopectina, a maioria deles como monoésteres nas posições C-6 e C-3 das unidades de glucose (BLENNOW *et al.*, 2002; HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015; STAHL *et al.*, 2007; WOSIACKI; CEREDA, 1985). Eles podem ser tradicionalmente preparados por reação de amido granular com tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), ortofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de fosforila (POCl_3) ou trimetafosfato de sódio ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$) (HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015; KAUR; SINGH; SINGH, 2006; STAHL *et al.*, 2007). Esse processo é considerado uma modificação química, onde as propriedades físico-químicas do amido nativo podem sofrer alterações consideráveis pela introdução de grupos substituintes na molécula de amido (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CARBINATTO *et al.*, 2012; CONFORTI; LUPANO, 2007; CORDENUNSI *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2013; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a).

As propriedades químicas e funcionais dos amidos fosfatados dependem da fonte de amido, do tipo e concentração do reagente e das condições da reação (tempo, temperatura, pH, presença de catalisador) (KAHRAMAN; KOKSEL; NG, 2015).

A fosfatação com tripolifosfato de sódio (TPS) tem sido empregada devido à sua capacidade de promover alterações nas propriedades do amido com grau de substituição

controlado e por apresentar baixo custo (SECHI; MARQUES, 2017). Embora várias fontes botânicas de amido tenham sido estudadas após a fosfatação (BLENNOW *et al.*, 2002; CARBINATTO *et al.*, 2012; HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015; KAHRAMAN; KOKSEL; NG, 2015; KAUR; SINGH; SINGH, 2006; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; STAHL *et al.*, 2007), o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tripolifosfato de sódio nas propriedades térmicas, de pasta, estruturais e morfológicas dos amidos de milho e de pinhão.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Araucaria angustifolia* foram coletadas em junho de 2016, na Floresta Nacional de Três Barras-SC-Brasil, com a Autorização para Atividades com Finalidade Científica nº. 53789-1, aprovada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO.

O amido de pinhão foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Costa *et al.* (2013), que compreende as etapas de descascamento, remoção da película aderida à semente e do embrião, trituração, filtração, decantação, secagem e filtração (peneira de 60 mesh). O amido de milho (Maiserta®, lote 16/03/17) foi adquirido no comércio local em Ponta Grossa-PR. Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

3.2.1 Fosfatação dos amidos

Os amidos de milho e de pinhão foram fosfatados separadamente de acordo com Lim; Seib (1993), com algumas modificações:

- Etapa 1: 5 g de TPS foram adicionadas em 100 mL de água e 5 g de sulfato de sódio. O pH da solução foi ajustado para 9,5. Todos os ajustes de pH foram realizados usando soluções previamente padronizadas de NaOH ou HCl 1 mol L⁻¹.

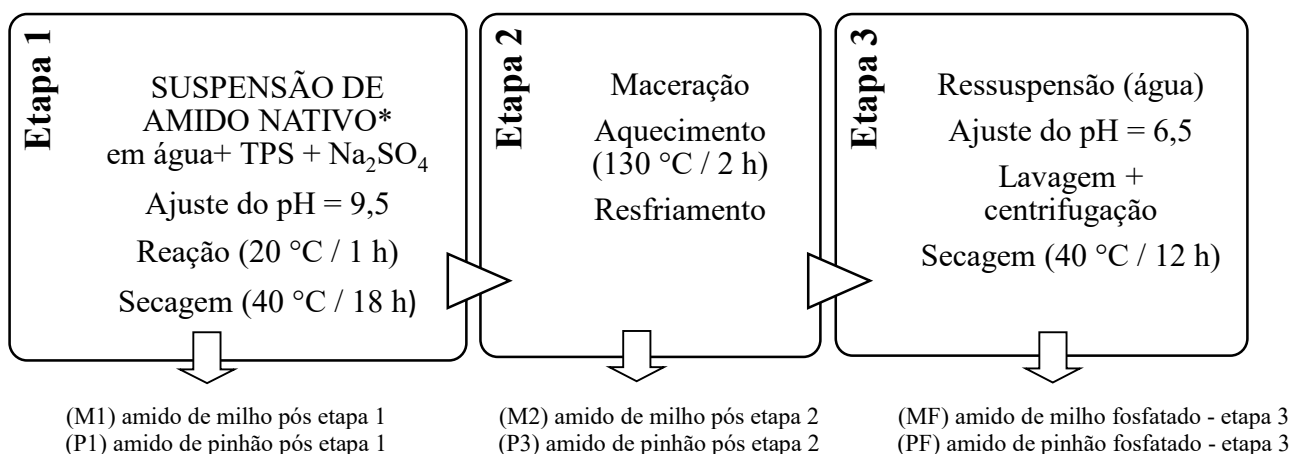
Após, 100 g de amido de milho ou de pinhão foram adicionados, e as suspensões foram ajustadas para 45 % de amido por adição de água suficiente. O pH foi novamente ajustado para 9,5 e as suspensões foram homogeneizadas com agitador magnético (20 °C / 1 h). As amostras foram secas (40 °C / 18 h).

- Etapa 2: cada amostra seca foi macerada e submetida a aquecimento (130 °C / 2 h) para efetivar a fosfatação.

- Etapa 3: O amido fosfatado foi disperso em 120 mL de água e depois submetido a centrifugação (1250 rpm / 4 ° C / 10 min). O precipitado foi novamente disperso em água (200 mL) para ajustar o pH para 6,5, seguido por mais três lavagens com água deionizada (200 mL cada). Finalmente, a amostra foi centrifugada para remover os sais, seca em estufa (40 °C / 12 h) e mantida em dessecador com cloreto de cálcio anidro.

Como forma de avaliar a fosfatação de amidos durante o experimento, uma amostra foi coletada no final de cada etapa, resfriada à temperatura ambiente em um dessecador com cloreto de cálcio anidro e depois nomeada conforme mostrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Etapas de fosfatação de amidos de milho e pinhão



*as amostras (MN) e (PN) são os amidos de milho e de pinhão nativos, respectivamente

3.2.2 Determinação do conteúdo de fósforo e grau de substituição

O teor de fósforo dos amidos nativos (MN e PN) e fosfatados (MF e PF) foi determinado colorimetricamente a 725 nm em triplicata. O grau de substituição (DS) foi calculado de acordo com Hong *et al.* (2015). Nos amidos resultantes das etapas 1 e 2, o teor de fósforo não foi determinado porque a reação não havia sido concluída.

3.2.3 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria (TG) foi realizada utilizando o equipamento TGA-50 (Shimadzu) após a calibração de acordo com as especificações do fabricante, com peso padrão e verificada com oxalato de cálcio monohidratado. As seguintes condições foram adotadas: massa da amostra de aproximadamente 7,0 mg em cadinhos de α -alumina; fluxo de ar de 150 mL min⁻¹;

taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 650 °C. As perdas de massa foram calculadas usando o software de análise de dados TA-60 WS (COSTA *et al.*, 2013).

3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As temperaturas e entalpias envolvidas na gelatinização do amido foram obtidas em um equipamento DSC Q-200 (TA Instruments Ltda) nas seguintes condições: massa da amostra de aproximadamente 2,5 mg (suspensão 1:4 de amido:água (m/v)), colocada em cadinhos de alumínio posteriormente selados, fluxo de ar de 50 mL min⁻¹; taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 100 °C. O software Universal Analysis foi utilizado para obter e interpretar as curvas. O equipamento foi previamente calibrado de acordo com as especificações do fabricante e verificado com padrão de índio (99,99 % de pureza) (COSTA *et al.*, 2013).

3.2.5 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta das amostras foram obtidas com o equipamento RVA-4 (Newport Scientific, Austrália), onde 28 g de uma suspensão de 8 % de amido (b.s.) foram preparados e submetidos a aquecimento (até 95 °C) e resfriamento (até 50 °C) (BET *et al.*, 2016). A umidade das amostras foi verificada previamente por termogravimetria.

3.2.6 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)

Os padrões de cristalinidade das amostras foram obtidos utilizando difratômetro de raios X (Rigaku, Ultima 4) nas seguintes condições: radiação de CuK α ($\lambda = 1,544 \text{ \AA}$), voltagem de 40 kV, corrente de 20 mA, velocidade de escaneamento de 0,5 ° min⁻¹, geometria de Bragg-Brentano $3^\circ < \theta < 40^\circ$ (2 θ). A cristalinidade relativa (CR) foi calculada de acordo com Polnaya *et al.* (2013) usando o software Origin (Microcal Inc., Northampton, MA, versão 6.0).

3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

O microscópio MIRA 3 (Tescan, República Tcheca) foi utilizado para avaliar o diâmetro e a forma dos grânulos de amido. Essa análise foi realizada utilizando uma tensão de elétron de 15 kV na pistola de emissão de campo, gerada por um filamento de lâmpada de tungstênio. A imagem foi gerada por elétrons secundários (SE) (BET *et al.*, 2016).

3.2.8 Análise Estatística

Uma vez realizadas as análises em triplicata, a normalidade dos dados foi assumida e a homocedasticidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Para verificar se as amostras diferiam, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e, se houvesse distinções, o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para comparar as médias. Para o cálculo foi utilizado o software Action Stat versão 3.3 (Estatcamp, São Paulo, Brasil).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Teores de fósforo e sódio e grau de substituição

O amido de pinhão nativo apresentou maior teor de fósforo que o amido de milho (Tabela 3.1). Comparado com outros estudos, apresentou um valor intermediário entre os obtidos por Wosiacki; Cereda (1985) (0,047 %) e Stahl *et al.* (2007) (0,01 %). O teor de fósforo no amido de milho nativo foi semelhante ao encontrado por outros autores (AI; JANE, 2015). Nos amidos de cereais, o fósforo corresponde naturalmente corresponde a cerca de 0,01 a 0,07 %, estando presente principalmente na forma de fosfolipídios (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

Tabela 3.1 - Teor de fósforo (P), grau de substituição (DS) e resultados de gelatinização por DSC dos amidos de milho e pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.

Amostra			Resultados DSC				
	P (%)	DS	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔT (°C)	ΔH_{gel} (J g ⁻¹)
MN	0,010±0,007 ^c		64,50±0,09 ^b	70,31±0,07 ^b	74,06±2,27 ^c	9,56±2,19 ^{ef}	12,07±0,23 ^b
M1			69,01±0,05 ^a	76,27±0,22 ^a	82,75±0,55 ^a	13,74±0,57 ^{abc}	12,84±0,27 ^b
M2			62,05±0,12 ^c	69,34±0,26 ^{cd}	72,04±0,11 ^{cd}	9,99±0,09 ^{def}	5,96±0,09 ^d
MF	0,304±0,012 ^a	0,016	56,44±1,07 ^e	67,32±0,35 ^{de}	71,36±2,11 ^{cde}	14,92±1,05 ^{ab}	4,28±0,47 ^e
PN	0,035±0,016 ^c		59,59±0,20 ^d	66,51±0,09 ^e	68,47±0,01 ^e	8,88±0,21 ^f	8,61±0,40 ^e
P1			63,78±0,08 ^b	71,95±0,10 ^b	79,23±0,24 ^b	15,45±0,30 ^a	15,72±0,42 ^a
P2			57,08±0,76 ^e	66,48±1,35 ^e	69,18±0,44 ^{de}	12,09±0,83 ^{cde}	2,64±0,09 ^f
PF	0,150±0,005 ^b	0,008	56,68±0,91 ^e	65,70±1,30 ^e	68,07±0,48 ^{de}	12,40±0,47 ^{bcd}	2,81±0,18 ^f

To temperatura “onset” ou de início; Tp temperatura de pico; Tc temperatura “endset” ou de conclusão; $\Delta T = T_c - T_o$ intervalo de temperatura de gelatinização; ΔH_{gel} variação de entalpia de gelatinização.

^{a, b, c}Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ambas as amostras fosfatadas tiveram seu teor de fósforo aumentado nas condições do presente estudo. Estes resultados estão de acordo com os requisitos legais de nível de fósforo para aplicação em alimentos, uma vez que não excederam a 0,4 % (FAO, 2001).

O amido de milho fosfatado (MF) apresentou grau de substituição (DS) duas vezes maior que o de pinhão (PF). No entanto, Stahl *et al.* (2007) relataram valores iguais (0,015) de DS para amido de pinhão e de milho após fosfatação e diálise, empregada devido à presença de fósforo não ligado, uma vez que nem todo o sal de fósforo do TPS reage durante a modificação. Como no presente estudo a concentração de TPS utilizada foi menor, não houve necessidade de diálise, inclusive porque o teor final de fósforo não excedeu o limite estabelecido.

Neste trabalho, sugere-se que a presença de poros no amido de milho, visualizada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 3.5), favoreceu o acesso dos grupos fosfato ao interior do amido, uma vez que existe uma área superficial maior para o reagente químico. No caso do amido de pinhão, a ausência de poros ou trincas limita a presença do reagente na superfície externa, dificultando sua penetração no grânulo (BEMILLER, 1997; HUBER; BEMILLER, 2001).

Além disso, possíveis diferenças encontradas no grau de substituição podem estar relacionadas às condições utilizadas durante a modificação, como temperatura, ajuste do pH e concentração utilizados (LIU; RAMSDEN; CORKE, 1999). Segundo Ascheri, Pereira e Bastos (2014), o teor de fósforo está diretamente ligado à concentração de TPS usada na fosfatação. Além disso, a quantidade de água também é fundamental, pois favorece a seletividade da reação entre os reagentes e as cadeias de amido (TOMASIK; SCHILLING, 2004).

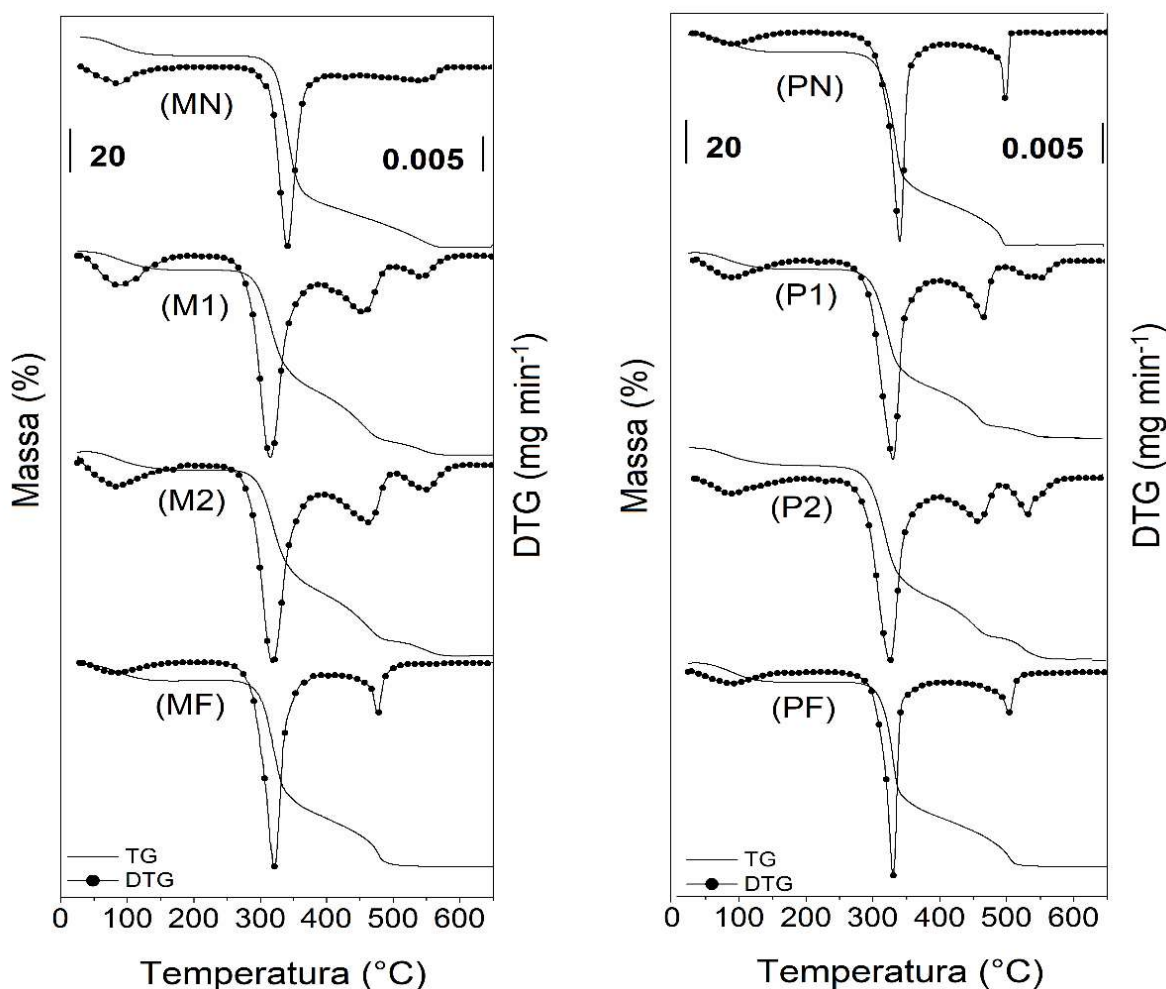
3.3.2 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

Conforme mostrado na Figura 3.2, foram observadas três perdas de massa para as amostras nativas (MN, PN) e fosfatadas (MF, PF). A primeira corresponde à desidratação e perda de compostos voláteis (como reagentes ainda presentes nas amostras modificadas), seguido de um período de estabilidade térmica. A segunda e terceira perdas de massa estão relacionadas à degradação e oxidação das cadeias amilose e amilopectina, até a formação de cinzas (COSTA *et al.*, 2013). No entanto, para as amostras M1, M2, P1 e P2 houve uma quarta perda de massa, imediatamente após a oxidação. Essa perda de massa adicional provavelmente ocorreu devido à presença de resíduos de TPS nas amostras, os quais não foram completamente removidas durante essas etapas.

Isso corrobora com o menor teor de cinzas das amostras (Tabela 3.2) após a conclusão da terceira etapa da fosfatação, na qual lavagens sucessivas com água deionizada foram realizadas para remover o fósforo residual, bem como os reagentes utilizados durante a modificação.

O teor de cinzas calculado para cada amostra foi: (MN) 3,17 %; (M1) 12,00 %; (M2) 11,64 %; (MF) 5,00; (PN) 5,20 %; (P1) 11,90 %; (P2) 8,80 % e (PF) 4,20 %. O maior teor de cinzas das amostras fosfatadas em relação às amostras nativas também destaca a adição de fósforo ao amido.

Figura 3.2 - Curvas TG/DTG dos amidos de milho (esquerda) e de pinhão (direita), nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.



Conforme apresentado na Tabela 3.2, a umidade das amostras variou entre 7,49 e 8,69 %. Valores entre 10,5 e 11,2 % foram encontrados por outros autores (BET *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2013). A temperatura de desidratação, observada na primeira perda de massa, foi semelhante para os amidos nativos.

As amostras obtidas após a primeira e segunda etapas (M1, M2, P1 e P2) apresentaram uma temperatura final mais alta da primeira perda de massa. Ou seja, essas amostras apresentaram maior dificuldade para perda de massa durante a desidratação, possivelmente devido à capacidade de retenção de água do TPS não ligado.

A temperatura inicial (Ti) da segunda perda de massa de amido de milho nativo foi ligeiramente maior que o amido de pinhão nativo, indicando maior estabilidade térmica. Após a fosfatação, o amido de milho teve sua estabilidade térmica reduzida de 272 ° C para 244 ° C, enquanto o amido de pinhão, após as três etapas, praticamente manteve sua estabilidade térmica semelhante à sua forma nativa. Isso pode estar relacionado ao maior grau de substituição de grupos fosfato na amostra de amido de milho, diminuindo sua estabilidade.

Tabela 3.2 - Resultados de TG/DTG para os amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.

Amostra	Evento	1ª perda	estabilidade	2ª perda	3ª perda	4ª perda
MN	Δm (%)	8,45	-	70,67	19,62	-
	Ti-Tf (°C)	30 - 160	160 - 272	272 - 405	405 - 585	-
	Tp (°C)	85,13	-	340,43	404,55	-
M1	Δm (%)	7,98	-	53,41	20,9	5,7
	Ti-Tf (°C)	30 - 182	182 - 242	242 - 392	392 - 498	498 - 595
	Tp (°C)	86,29	-	314,83	455,22	542,82
M2	Δm (%)	7,64	-	53,5	20,58	6,42
	Ti-Tf (°C)	30 - 188	188 - 250	250 - 396	396 - 500	500 - 601
	Tp (°C)	82,27	-	318,53	462,1	550,7
MF	Δm (%)	7,66	-	64,04	23,46	-
	Ti-Tf (°C)	30 - 164	164 - 244	244 - 394	394 - 528	-
	Tp (°C)	84,39	-	321,11	476,93	-
PN	Δm (%)	8,22	-	70,45	20,47	-
	Ti-Tf (°C)	30 - 162	162 - 265	265 - 411	411 - 523	-
	Tp (°C)	85,38	-	337,4	496,08	-
P1	Δm (%)	7,74	-	56,42	17,83	6,07
	Ti-Tf (°C)	30 - 175	175 - 255	255 - 396	396 - 490	490 - 583
	Tp (°C)	84,71	-	327,07	462,47	549,86
P2	Δm (%)	7,49	-	56,99	16	9,38
	Ti-Tf (°C)	30 - 170	170 - 244	244 - 395	395 - 492	492 - 588
	Tp (°C)	83,07	-	322,8	456,15	528,87
PF	Δm (%)	8,69	-	63,35	23,21	-
	Ti-Tf (°C)	30 - 162	162 - 263	263 - 395	395 - 543	-
	Tp (°C)	87,3	-	329,96	503,26	-

Δm , variação de massa (%); Ti, temperatura inicial de cada evento térmico; Tf, temperatura final de cada evento térmico; Tp, temperatura de pico (°C).

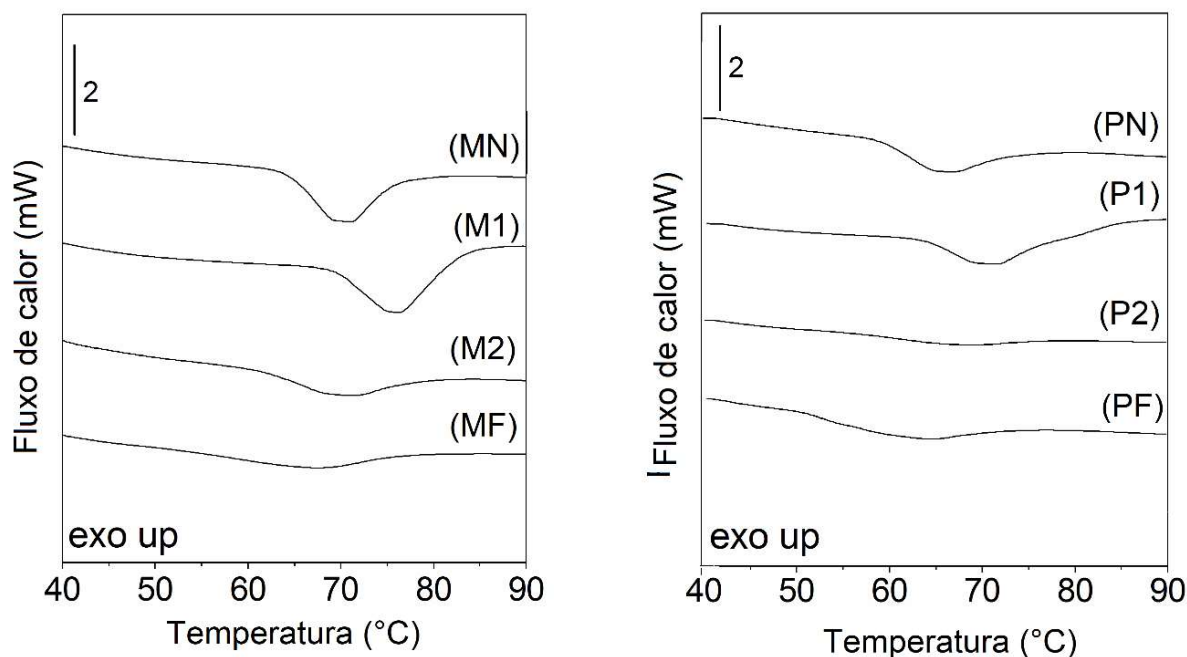
Embora tenha havido uma diminuição na estabilidade térmica após a modificação, foi registrada menor perda de massa para as amostras (M1, M2, P1, P2) após as duas primeiras etapas da fosfatação. A incorporação de grupos fosfato parece ter dificultado a decomposição das cadeias de amilose e amilopectina do amido.

A terceira e quarta etapas podem estar relacionadas à oxidação das amostras. Possivelmente o fósforo residual não decomposto nessa faixa de temperatura, tende a ser decomposto a uma temperatura mais alta (4ª etapa) e permanece como cinzas a 650 ° C, temperatura final de análise.

3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC dos amidos de milho e de pinhão realizadas nas três etapas de fosfatação são mostradas na Figura 3.3, as quais podem ser comparadas às amostras nativas.

Figura 3.3 - Curvas DSC de amidos de milho (esquerda) e de pinhão (direita), nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.



De acordo com os resultados obtidos por DSC (Tabela 3.1), as temperaturas de gelatinização dos amidos nativos de milho e pinhão (MS, PN) foram semelhantes às relatadas por outros autores (CONFORTI; LUPANO, 2007; HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015), mostrando intervalos de temperatura (ΔT) semelhantes entre si.

Os amidos fosfatados mostraram um aumento no intervalo das temperaturas de gelatinização. Sugere-se que isso esteja relacionado às ligações cruzadas promovidas pela inserção de grupos fosfato, fortalecendo as ligações de hidrogênio entre as cadeias de amido e reduzindo o espaço para a penetração de água. Portanto, foi necessário um intervalo de temperatura mais alta para a gelatinização (JUANSANG *et al.*, 2012).

Os valores obtidos para ΔH_{gel} do amido de milho nativo foram superiores aos do amido de pinhão nativo. Resultados semelhantes foram obtidos por Bello-Pérez *et al.* (2006), mas ambos apresentaram ΔH_{gel} menor que os obtidos por outros autores (CONFORTI; LUPANO, 2007; HONG; GOMAND; DELCOUR, 2015).

Após o primeiro estágio da fosfatação, baixas temperaturas foram empregadas e possíveis ligações aleatórias inter e intramoleculares nos grânulos de amido podem ter ocorrido, promovendo uma maior organização molecular, com consequente estabilização das cadeias, exigindo maior energia e temperatura para o início da gelatinização (YONEYA *et al.*, 2003). Outro fator que também pode influenciar é a presença de fósforo residual, que ainda não participou efetivamente da reação até esse estágio, dificultando a gelatinização (KAUR; SINGH; SINGH, 2006).

A partir da segunda etapa, o aumento da temperatura a 130 °C pode ter favorecido a reorientação das cadeias e novas ligações com os grupos fosfato, reduzindo a resistência ao processo de intumescimento, exibindo uma diminuição nas temperaturas e na energia para gelatinizar (BLASZCZAK *et al.*, 2011). Nesta fase, a fosfatação das cadeias de amido parece ter ocorrido, pois houve uma queda acentuada nos parâmetros medidos pelo DSC. Lim e Seib (1993) discutiram a ocorrência de fosfatação após esta segunda etapa, no qual o amido seco é macerado e exposto a altas temperaturas (130 °C) por longos períodos (2 h).

Após modificação completa com TPS, houve uma redução significativa nas temperaturas de início para ambos os amidos. Isso pode estar relacionado à repulsão iônica promovida pela inserção de grupos fosfato entre as cadeias de amido, facilitando a penetração da água, devido à diminuição das forças de interação. Além disso, a redução na entalpia de gelatinização também observada pode estar correlacionada com o surgimento de ligações cruzadas com o grupo fosfato, estando de acordo com os resultados observados por Yoneya *et al.* (2003) para amido de batata fosfatado com $PClO_3$. Em geral, a incorporação de grupos fosfato pode desestabilizar a estrutura cristalina dos grânulos de amido, o que mostrará menor temperatura de gelatinização e ΔH_{gel} em relação à amostra controle (AI; JANE, 2015). Shi *et al.* (2013) relataram que a região amorfa pode ser afetada com a fosfatação, inchando e favorecendo a gelatinização. Isso pode estar relacionado ao aumento na cristalinidade relativa encontrada para os dois amidos por difratometria de raios X pelo método do pó (figura 3.4).

Huo et. al. (2017) também observaram um aumento no intervalo de temperatura de gelatinização, bem como uma diminuição na ΔH_{gel} para amido de ervilha após fosfatação por extrusão de parafuso duplo, possivelmente causadas devido à gelatinização parcial durante o processo de extrusão.

3.3.4 Propriedades de pasta

Comparando os resultados obtidos para os amidos nativos, o amido de pinhão apresentou menor temperatura de pasta e tempo de pico, bem como maior viscosidades de pico e final, *setback* e *breakdown* (Tabela 3.3). Resultados semelhantes foram relatados por Stahl et al. (2007) para amidos de milho e pinhão nativos.

Tabela 3.3 - Propriedades de pasta de amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS

Amostra	Temperatura de pasta (°C)	Tempo de pico (s)	Viscosidade de pico (mPa s)	<i>Setback</i> (mPa s)	<i>Breakdown</i> (mPa s)	Viscosidade final (mPa s)
MN	80,3 ± 0,1 ^a	528,0 ± 0,4 ^a	2283,0 ± 2,0 ^d	939,0 ± 0,7 ^d	953,0 ± 2,6 ^d	2269,0 ± 1,5 ^d
MF	57,0 ± 0,6 ^b	343,8 ± 0,1 ^b	6327,0 ± 1,0 ^a	992,0 ± 1,0 ^c	2761,0 ± 1,0 ^b	4558,0 ± 1,0 ^a
PN	67,1 ± 0,1 ^c	340,2 ± 0,2 ^c	2559,3 ± 1,1 ^c	1317,6 ± 0,7 ^b	1483,3 ± 1,7 ^c	2394,0 ± 0,8 ^c
PF	49,9 ± 0,1 ^d	304,2 ± 0,3 ^d	4879,0 ± 0,8 ^b	1725,0 ± 1,7 ^a	3322,0 ± 1,5 ^a	3282,0 ± 2,0 ^b

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os resultados de RVA mostram a influência da fosfatação nos amidos de milho e pinhão em suas propriedades de pasta. Ambas as amostras tiveram a temperatura de pasta reduzida, o que está de acordo com os valores de temperatura de pico (T_p) obtidos pelo DSC, que também foram menores após a modificação com TPS.

Os amidos de milho e pinhão apresentaram redução no tempo de pico e maior viscosidade após a fosfatação. A formação de uma pasta mais viscosa durante o aquecimento de uma suspensão de amido está relacionada à sua maior capacidade de se ligar à água. De acordo com Ai e Jane (2015), as cargas negativas dos amidos fosfatados se repelem, promovendo maior capacidade de inchamento do grânulo, concedendo ao amido fosfatado maior viscosidade a uma temperatura mais baixa.

A mesma tendência em relação à temperatura de pasta e viscosidade de pico foi encontrada por Ascheri; Pereira e Bastos (2014) para amido de *Solanum lycocarpum* modificado com TPS. Os autores apontaram que o aumento na viscosidade de pico ocorre

possivelmente devido à presença de forças intermoleculares que fortalecem a região amorfa dos grânulos de amido.

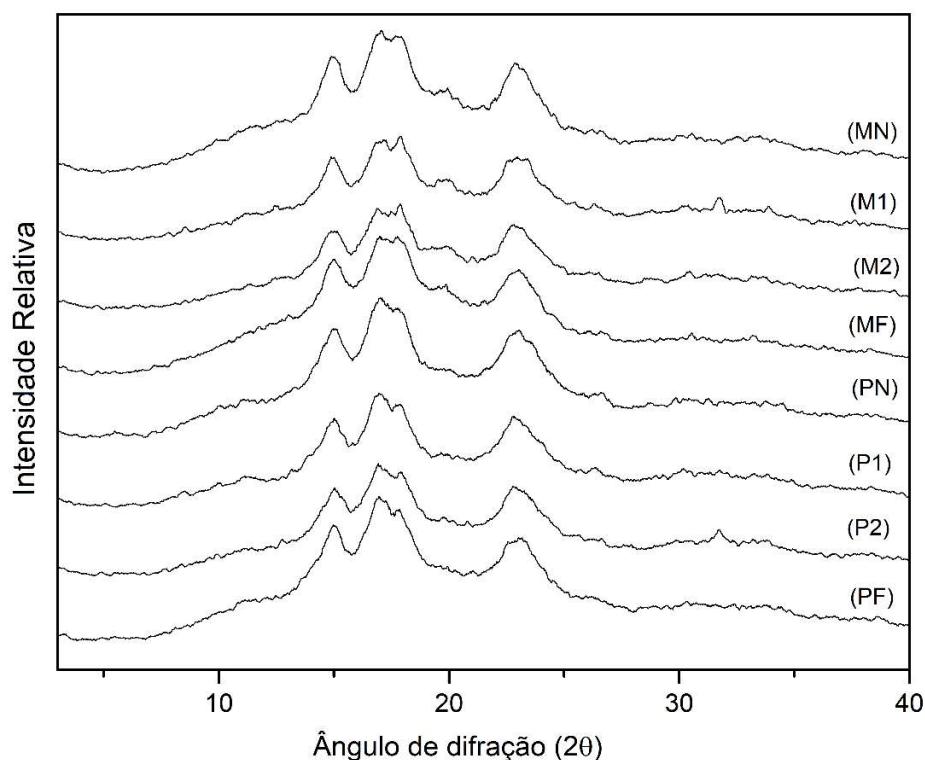
A fosfatação também aumentou o *breakdown* de ambas as amostras. Isso indica a maior capacidade de intumescimento dos grânulos fosfatados, com consequente aumento da suscetibilidade à ruptura e diminuição da capacidade de suportar a tensão de cisalhamento durante o aquecimento (POLNAYA *et al.*, 2013).

Após completa modificação com STPP, as amostras (MF e PF) apresentaram maiores valores de viscosidade final e *setback* que os amidos nativos, como também observado por Polnaya *et al.* (2013). O amido de pinhão fosfatado (PF) apresentou menor viscosidade final em relação ao amido de milho fosfatado (MF).

3.3.5 Difratometria de raios X pelo método do pó (DRX)

De acordo com os difratogramas (figura 3.4), o amido de milho apresentou picos em 15, 17, 18 e 23 ° (2 θ), sendo seu padrão de difração classificado como tipo-A. O amido de pinhão apresentou picos em 15 ° e 23 ° e um dublete em 17 e 18 ° (2 θ), classificado como tipo-C. Esses resultados corroboram com outros estudos (ISMAILOGLU; BASMAN, 2015; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a).

figura 3.4 - Padrão de difração de raios X de amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.



Após modificação por TPS, foram observadas pequenas alterações nos picos de 17 ° e 18 ° (2θ). Essa característica pode estar associada a grupos fosfato inseridos nas cadeias de amido, o que causa uma distribuição espacial mais aleatória, promovendo um possível rearranjo estrutural diferente do padrão original (SECHI; MARQUES, 2017). Essas mudanças não são suficientes para alterar o padrão de cristalinidade, apenas sugerem uma reorganização das cadeias.

A cristalinidade relativa (CR) dos grânulos de amido pode ser estimado quantitativamente com base na relação entre as áreas dos picos e a área total dos difratogramas. O amido de pinhão geralmente apresenta valores mais baixos de CR (25,4 % a 30,7 %) (COSTA *et al.*, 2013; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a) do que o amido de milho (27 a 40 %) (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

A fosfatação aumentou a CR dos amidos de milho e de pinhão (Tabela 3.4). Como a modificação foi realizada em baixas concentrações de TPS (5 %), não há alterações severas na estrutura do amido (SECHI; MARQUES, 2017), mas a reorganização da cadeia pode alterar a CR das amostras. Além disso, conforme observado por DSC, os grupos fosfato podem reagir com a região amorfa do grânulo, aumentando sua cristalinidade (RODRIGUEZ-SANDOVAL; OTÁLVARO-ARENAS; HERNANDEZ, 2017).

Tabela 3.4 – Cristalinidade relativa (CR, %) de amidos de milho e de pinhão, nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.

Amostra	CR %
MN	21,06 ±0,23 ^{de}
M1	21,83 ±0,15 ^d
M2	21,57 ±0,60 ^d
MF	25,43 ±0,34 ^b
PN	23,24 ±0,61 ^c
P1	22,27 ±0,79 ^{cd}
P2	20,06 ±0,58 ^e
PF	26,93 ±0,33 ^a

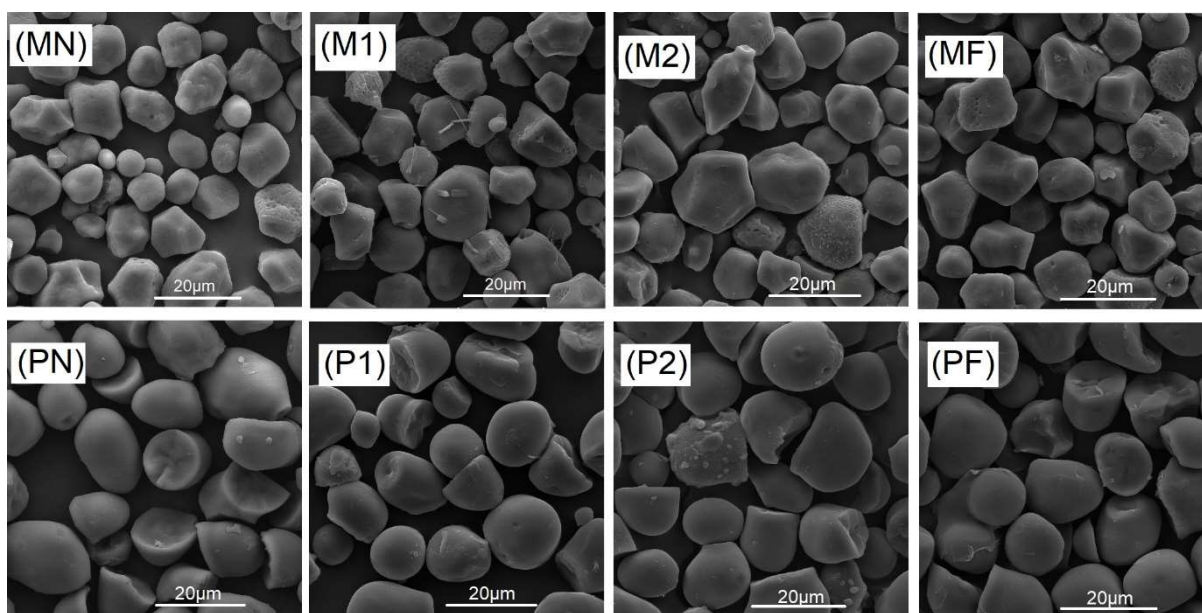
Shi *et al.* (2013) e Koo; Lee; Lee (2010) relatam que a mistura de trimetafosfato de sódio e tripolifosfato de sódio (99:1, m/m) promoveu a formação de ligações cruzadas principalmente nas regiões amorfas do grânulo de amido, sem alteração em padrões de cristalinidade. No entanto, promoveu um aumento na CR de ambas as amostras. Além disso, o reagente age como uma ponte, reduz a distância entre as moléculas sem alterar sua estrutura cristalina.

3.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Os grânulos de amido de pinhão nativos apresentaram uma mistura de formas arredondadas e ovais, com superfície lisa, sem presença de poros, mas com algumas depressões (Figura 3.5). Resultados similares foram encontrados por Pinto *et al.* (2015). O amido de milho nativo tem uma forma poligonal com bordas bem definidas, conforme relatado por Zhang; Ao; Hamaker (2006), com alguns grânulos com superfície porosa e outros com forma arredondada e tamanho menor ($<7\mu\text{m}$).

O diâmetro médio variou entre 10-27 μm e 8-17 μm para os amidos de pinhão e de milho, respectivamente, resultados semelhantes aos encontrados por outros autores (COSTA *et al.*, 2013; DAUDT *et al.*, 2015; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a).

Figura 3.5 - Microimagens (2000x) de amidos de milho (acima) e de pinhão (abaixo), nativos e modificados por TPS, em cada etapa da fosfatação.



O tamanho ou a forma dos grânulos de amido de pinhão não foram alterados após a fosfatação. Este comportamento também foi observado por Kaur; Singh e Singh (2006) para o amido de batata reticulado com epícloridrina ($\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$) e cloreto de fosforila (POCl_3) em diferentes concentrações.

Foi possível verificar a presença de "cristais" de TPS na microimagem da amostra de milho após a primeira etapa da fosfatação, na qual ainda não havia sido realizado nenhum processo de lavagem.

3.4 CONCLUSÃO

A modificação dos amidos de milho e pinhão com tripolifosfato de sódio promoveu o aumento do teor de fósforo nos grânulos, e o amido de milho apresentou maior grau de substituição.

A primeira etapa da fosfatação aumentou a temperatura de pico e a entalpia da gelatinização. No entanto, após todas as etapas, o valor dos dois parâmetros foi menor em relação aos amidos nativos.

Quatro perdas de massa foram identificadas após a segunda etapa da fosfatação. Uma diminuição na estabilidade térmica foi observada após a modificação.

A fosfatação de ambos os amidos promoveu uma redução no tempo de pico e temperatura de pasta e um aumento nas viscosidades de pico e final, bem como no *setback* e *breakdown*.

O padrão de difração não foi afetado pela fosfatação, mas a reação aumentou a cristalinidade relativa dos amidos de milho e de pinhão.

A modificação não afetou a morfologia e o tamanho dos grânulos, mas promoveu pequena fragmentação no amido de milho.

**CAPÍTULO 4 - EFEITO DO MOINHO DE BOLAS NAS PROPRIEDADES
TÉRMICAS, ESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS DE AMIDOS FOSFATADOS
DE MILHO E PINHÃO**

O conteúdo deste capítulo está publicado na revista *Starch/Stärke*:

**Effect of Ball Milling Treatment on Thermal, Structural, and Morphological Properties
of Phosphated Starches from Corn and Pinhão**

Cleoci Beninca, Cristina Soltovski de Oliveira, Camila Delinski Bet,
Radla Zabian Bassetto Bisinella, Caroline Gaglieri, Egon Schnitzler.

(DOI: 10.1002/star.201900233)

RESUMO

No capítulo anterior foram descritas as etapas de fosfatação dos amidos de milho e de pinhão com tripolifosfato de sódio (TPS) e os efeitos que esta modificação química causou nas propriedades dos grânulos. As modificações químicas e físicas são realizadas com o intuito de proporcionar características específicas ao amido, ampliando a possibilidade de sua aplicação. O tratamento físico realizado com moinho de bolas tem sido aplicado em amido, promovendo redução da entalpia e da cristalinidade relativa de amidos, com alguns danos na sua estrutura. Neste capítulo foram avaliadas as propriedades térmicas (DSC, TG/DTG), estruturais (DRX e FTIR) e morfológicas (FEG-MEV) dos amidos de milho e de pinhão nativos e fosfatados, antes e após o tratamento com moinho de bolas. Além disso, a espectroscopia por dispersão de raios X por comprimento de onda (WDXRF), foi aplicada como uma nova técnica para mensurar os teores do fósforo e de sódio incorporados ao amido. Os resultados desta análise confirmaram a incorporação dos grupos fosfato aos amidos e a redução de fósforo e sódio nas amostras após a moagem. Os amidos duplamente modificados apresentaram menor capacidade de retenção de umidade durante análise termogravimétrica e menor estabilidade térmica. Todos os tratamentos reduziram a entalpia de gelatinização, sendo mais acentuada para os amidos duplamente modificados. Não foram observadas alterações nos padrões de DRX após as modificações, mas a cristalinidade relativa foi reduzida drasticamente após fosfatação seguida de moagem. Alterações nos resultados de FTIR foram mais pronunciadas para as amostras após tratamento com moinho de bolas, e corroboram com os observados por DSC e DRX. Alterações morfológicas foram observadas apenas nas amostras moídas. A dupla modificação (fosfatação seguida de moagem) promoveu alterações mais intensas nas propriedades térmicas, estruturais e morfológicas dos amidos de milho e de pinhão do que as modificações realizadas de forma isolada.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*. Amido fosfatado. Modificação física.

ABSTRACT

In our previous study, the corn and pinhão starches were phosphated with sodium triphosphosphate and the effects of this chemical modification were evaluated. However, physical modifications also provide specific characteristics to starch, increasing the possibility of its application. This way, in this study, the thermal (TG/DTG, DSC), structural (XRD, FTIR) and morphological (FEG-SEM) properties of native and phosphated corn and pinhão starches were evaluated, before and after ball milling treatment. In addition, wavelength dispersive X-ray spectroscopy (WDXRF) analysis has been applied as a new technique for measuring phosphorus and sodium levels. The results confirmed the incorporation of phosphate groups in starches and the reduction of phosphorus and sodium after milling. Double modified starches had lower moisture retention capacity during TG and lower thermal stability. All treatments reduced gelatinisation enthalpy, being more pronounced for double modified starches. No changes in XRD patterns were observed after modifications, but relative crystallinity was drastically reduced after double modification. Changes in FTIR results were more pronounced after physical treatment, corroborating with DSC and XRD results. Morphological changes were observed only in the milled samples. The double modification promoted more intense changes in the properties of corn and pinhão starch than the modifications made alone.

Keywords: *Araucaria angustifolia*. Phosphated starch. Physical modification.

4.1 INTRODUÇÃO

O pinhão, semente de *Araucaria angustifolia*, é uma nova fonte de amido não convencional (BENINCA *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2015a). A composição proximal da semente revela seu valor nutricional. Além do amido que representa cerca de 64 % do seu peso em base seca, o pinhão contém aproximadamente 6,4 % de proteína, 1,0 % de lipídios, 5,2 % de fibra e 2,5 % de cinza (JORGE *et al.*, 2018).

Entre os minerais encontrados no amido, o fósforo é aquele que parece causar maiores diferenças nas suas propriedades físico-químicas (BENINCA *et al.*, 2019; WATERSCHOOT *et al.*, 2015). Para promover características diferenciadas visando a aplicação do amido, o teor de fósforo pode ser aumentado por modificações químicas (BENINCA *et al.*, 2019; BLENNOW *et al.*, 2002; KAUR; SINGH; SINGH, 2006; STAHL *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2018; YONEYA *et al.*, 2003).

Conforme descrito no capítulo anterior, após fosfatação com tripolifosfato de sódio (TPS) o amido de pinhão apresentou menor temperatura de pasta e entalpia, e maior viscosidade final e cristalinidade relativa. A morfologia do amido não foi alterada pelo tratamento.

Assim como a modificação química, a modificação física também pode fornecer propriedades desejáveis ao amido (PINTO *et al.*, 2015a). Entre elas, sabe-se que o tratamento com moinho de bolas destrói a estrutura granular do amido devido à colisão, cisalhamento e atrito gerado durante o processo (FU *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018b). A moagem tem sido aplicada de quatro maneiras distintas: (1) como um único processo de modificação física (HE *et al.*, 2014; KIM; KIM, 2014; LIU *et al.*, 2011; MORAES; ALVES; FRANCO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2018b; TAMAKI *et al.*, 1998), (2) como pós-tratamento da hidrólise parcial de grânulos de amido, proporcionando maior eficiência do processo de moagem (SANGUANPONG *et al.*, 2003), (3) como um pré-tratamento de modificações químicas do amido para melhorar a eficiência da reação (FU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2015b), e (4) concomitante com modificações químicas (FU *et al.*, 2019; LV *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2015).

Portanto, os tratamentos com moinho de bolas e a fosfatação de amido têm sido estudados de forma individual. Ainda há pouca informação sobre a associação destas duas modificações em amidos.

Zhang *et al.* (2015) verificaram o efeito do moinho de bolas na eficiência da fosfatação do amido de milho. Para isso, o amido de milho foi modificado fisicamente com moinho de bolas em etanol anidro. Em seguida, o amido moído foi submetido à fosfatação com trimetafosfato de sódio (TMPS). A dupla modificação, nesta ordem, promoveu maior penetração do reagente, potencializando o efeito da fosfatação. Os autores não realizaram o processo inverso, ou seja, não há relatos sobre o efeito dessa modificação física no amido fosfatado.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do moinho de bolas nas propriedades dos amidos de milho e de pinhão em suas formas nativa e fosfatada.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do amido

O amido de pinhão foi extraído conforme descrito no capítulo anterior. Foi utilizado amido de milho comercial (Maiscerta, lote 16/03/17).

4.2.2 Fosfatação dos amidos

Os amidos de milho e de pinhão foram modificados em baixa concentração (5 %) de tripolifosfato de sódio (STPP), de acordo com as etapas detalhadamente descritas no capítulo anterior.

4.2.3 Moinho de Bolas

Cerca de 0,6 g de amido foram submetidos ao processo de moagem por moinho de bolas (Mixer Mill MM400, Retsch, Alemanha) na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Bauru, SP, BR). Duas bolas de aço inoxidável (ϕ 5 mm) permaneceram em contato com a amostra em um suporte (capacidade de 10mL) do mesmo material por 30 minutos em uma frequência de moagem de 30 Hz (OLIVEIRA *et al.*, 2018b). Nenhum solvente ou líquido foi adicionado. A moagem foi realizada nos amidos de milho e de pinhão, nativos e fosfatados.

As amostras de amido de cada fonte botânica foram nomeadas da seguinte forma: MN - milho nativo; MF - milho fosfatado; MM - milho tratado com moinho de bolas; MF+M - milho fosfatado moído; PN - pinhão nativo; PF - pinhão fosfatado; PM - pinhão tratado com moinho de bolas; PF+M - pinhão fosfatado moído.

4.2.4 Teores de fósforo e sódio por análise de espectroscopia por dispersão de raios X por comprimento de onda (WDXRF)

Cerca de 2 g de amostra foram prensadas em pastilhas finas de 10 mm de diâmetro. A análise quantitativa de fósforo e sódio foi realizada no espectrômetro WDXRF (Rigaku ZSX Primus II), com uma voltagem de aceleração de 15 kV, e em um tempo de detecção de 200 s (AHMADU *et al.*, 2018).

4.2.5 Determinação do Grau de Substituição e Alteração no Conteúdo de Fósforo após o tratamento com moinho de Bolas

O grau de substituição (DS, do inglês *degree of substitution*) de fósforo foi calculado de acordo com Hong; Gomand e Delcour (2015), conforme equação 1:

$$DS = \frac{162(\Delta P)}{3100 - 102(\Delta P)} \quad (1)$$

onde ΔP é a diferença entre o teor de fósforo (%) do amido fosfatado e do amido nativo verificado por WDXRF; 162 é a massa molar da unidade anidroglicose, 3100 é o peso atômico do fósforo multiplicado por 100, e 102 é a massa molar do grupo fosfato (NaPO_3^{-2}).

4.2.6 Alteração no Conteúdo de Fósforo após o tratamento com moinho de bolas

A alteração no teor de fósforo (%) após a moagem dos amidos nativos foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$APC = 100 - \left(\frac{B}{A} \cdot 100 \right) \quad (2)$$

onde A é o teor de fósforo do amido nativo (MN ou PN) e B é o teor de fósforo do amido nativo de mesma fonte botânica após tratamento com moinho de bolas (MM ou PM).

O mesmo cálculo foi realizado para verificar a alteração no teor de fósforo das amostras fosfatadas após tratamento com moinho de bolas. Neste caso, A é o teor de fósforo do amido fosfatado (MF ou PF) e B é o teor de fósforo do amido fosfatado de mesma fonte botânica após moagem (MF+M ou PF+M).

4.2.7 Termogravimetria (TG)

O sistema de análise térmica TGA-50 (Shimadzu, Japão) foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante. Para obtenção das curvas termogravimétricas, procedeu-se da seguinte forma: massa de amostra de aproximadamente 7,0 mg em cadinhos de α -alumina aberto; taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 30°C a 650°C ; fluxo de ar de 150 mL min^{-1} . Todos os pontos de perda de massa foram determinados com auxílio da derivada primeira das

curvas termogravimétricas (DTG) usando o software de análise de dados TA-60 (Shimadzu, Japão) (BET *et al.*, 2018a).

4.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O equipamento DSC Q-200 (TA Instruments, EUA) foi previamente calibrado de acordo com as especificações do fabricante e verificado com padrão de índio (99,99 % de pureza). Uma suspensão de amido:água (1:4, m/v) foi preparada em cadinho de alumínio, posteriormente selado e deixado em repouso durante cerca de 1 h a temperatura ambiente antes do início da análise. A análise foi realizada nas seguintes condições: massa de amostra de aproximadamente 2,5 mg, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ de 30 °C a 100 °C e vazão de ar de 50 mL min⁻¹ (OLIVEIRA *et al.*, 2018a). Os resultados foram obtidos em triplicata com o software Universal Analysis-2000 (TA Instruments, EUA).

O grau de gelatinização (GD, do inglês *gelatinization degree*), que relaciona o valor da entalpia do amido modificado (ΔH_{mod}) com o do amido nativo (ΔH_{nat}) foi calculado de acordo com Ratnayake; Otani e Jackson (2009) e Fu *et al.* (2019).

$$GD = \frac{\Delta H_{\text{nat}} - \Delta H_{\text{mo}}}{\Delta H_{\text{nat}}} \times 100 \quad (3)$$

Para fins de cálculo, foi utilizada a média final de três repetições (triplicatas) dos valores obtidos para ΔH_{mod} e ΔH_{nat} .

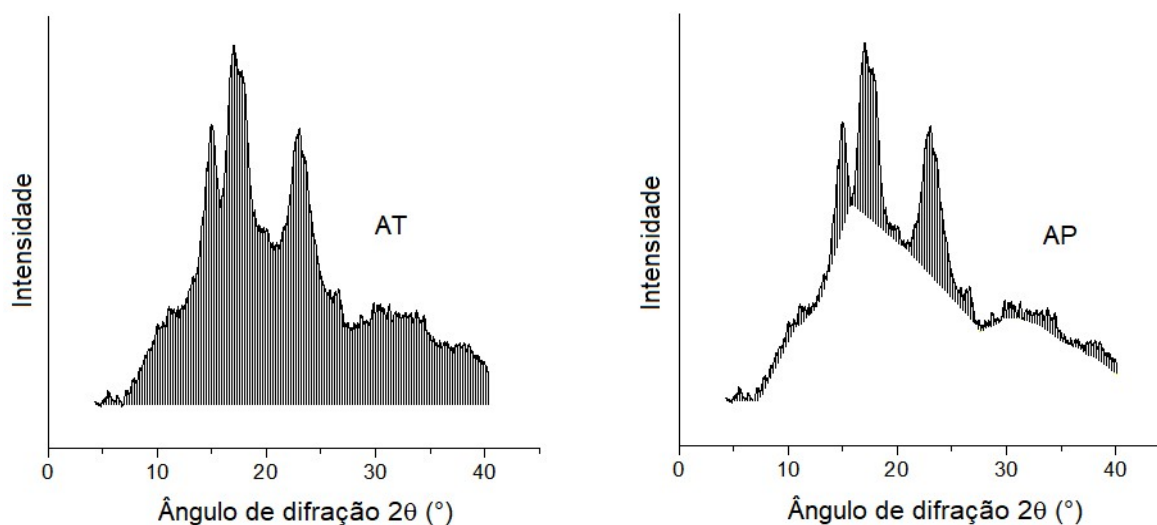
4.2.9 Difractometria de raios X pelo método do pó (DRX)

Os padrões de cristalinidade das amostras foram obtidos utilizando difratômetro de raios X (Rigaku, Ultima 4). Amostras de pó seco foram escaneadas usando radiação de CuK α ($\lambda = 1,544 \text{ \AA}$) a 40 kV e 20 mA. A região de varredura dos ângulos (2θ) foi de 3 a 40 °, velocidade de 0,5 ° min⁻¹, e passo de 0,02° (LACERDA *et al.*, 2015). Após plotar os difratogramas, o cálculo da cristalinidade relativa (CR) foi realizado pela integração das áreas total (AT) e de pico (AP), de acordo com a seguinte equação 4 e Figura 4.1:

$$CR (\%) = (AP/AT) \times 100 \quad (4)$$

sendo a área do pico (AP) relacionada à região cristalina, e a região amorfa é a diferença entre a área total (AT) e a área de pico (AP).

Figura 4.1 - Área total (AT) e Área do Pico (AP) marcadas no difratograma de DRX do amido para calcular a cristalinidade relativa (CR) das amostras



4.2.10 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectrômetro IRPrestige21 (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi usado para caracterizar as amostras. As pastilhas foram feitas a partir de uma mistura homogênea de 2 mg de amostra e 100 mg de KBr seco. Os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 64 varreduras na região de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ (BET *et al.*, 2019).

4.2.11 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Para obter as imagens em um microscópio MIRA 3 (Tescan, República Tcheca), as amostras foram pulverizadas sobre uma fita de carbono e metalizada com ouro (300 s; 40 mA). A forma e o tamanho dos grânulos de amido foram avaliados utilizando uma voltagem de elétrons de 15 kV no canhão de emissão de campo, gerada por um filamento de lâmpada de tungstênio. (BET *et al.*, 2019).

4.2.12 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata. Utilizou-se o programa Action Stat v. 3.3 (Estatcamp, São Paulo, Brasil) para avaliar estatisticamente a diferença entre as amostras. O teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para comparar as médias caso houvesse distinções na Análise de variância (ANOVA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os amidos de pinhão e de milho foram fosfatados com tripolifosfato de sódio. Após, as amostras nativas e fosfatadas foram submetidas ao processo de moagem e o efeito desses tratamentos nas propriedades dos amidos foi verificado.

4.3.1 Teores de fósforo e sódio por WDXRF e grau de substituição

A espectroscopia de raios X (XRF) é aplicada para verificar o conteúdo de elementos químicos em diferentes tipos de amostras. O primeiro artigo científico usando XRF para determinar teor de fósforo em amido foi publicado por Noda *et al.* (2006). Tem a vantagem de ser um procedimento analítico mais rápido, simples e seguro para a coleta de dados do que a análise química. Além disso é um método não destrutivo, quando não é necessário usar ligante na produção das pastilhas (NODA *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1, o amido de pinhão nativo (PN) apresentou maior teor de fósforo endógeno que o amido de milho nativo (C1). Ahmadu *et al.*, (2018) verificaram teores de fósforo iguais a 0,035 %, 0,022 % e 0,024 % em amidos de três cultivares de inhame (*Dioscorea rotundata*).

Tabela 4.1 - Teores de fósforo e sódio em amostras de amido analisadas por WDXRF, grau de substituição (DS) e alteração no teor de fósforo após moagem (APC)

Amostra	P (% m/m)	Na (% m/m)	DS	APC (%) *
MN	0,0208	n.d.		
MF	0,3930	0,5930	0,019	
MM	0,0161	n.d.		- 22,6
MF+M	0,3670	0,4670		- 6,6
PN	0,0472	n.d.		
PF	0,2200	0,2630	0,009	
PM	0,0275	n.d.		- 41,7
PF+M	0,1960	0,2590		- 10,9

Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M). n.d. = não detectado.

* em relação à mesma amostra antes da moagem, de acordo com a Equação 2.

O teor de fósforo das amostras determinadas por WDXRF foi ligeiramente superior ao detectado pelo método colorimétrico a 725 nm, apresentados no capítulo anterior. Relação semelhante foi apresentada por Noda *et al.* (2006) na comparação de fluorescência de raios X

por energia dispersiva (ED-XRD) e técnicas convencionais para determinar o teor de fósforo em amido de batata nativo.

Como esperado, os teores de fósforo e de sódio aumentaram após a modificação química (MF e PF). O grau de substituição do amido de milho foi maior do que o amido de pinhão, estando de acordo com os dados apresentados no capítulo anterior (BENINCA *et al.*, 2019). A presença de sódio foi detectada apenas nos amidos fosfatados (MF, MF+M, PF, PF+M). Esses resultados mostram a eficiência da fosfatação dos amidos de milho e de pinhão. Não foram encontrados outros estudos com quantificação de sódio em amido fosfatado.

Após o tratamento com moinho de bolas (MM, MF+M, PM, PF+M), o teor de fósforo foi reduzido. Sugere-se que alguns grupos fosfatos (NaPO_3^{-2}), que foram ligados às regiões mais externas da cadeia amilácea, foram perdidos durante o tratamento devido à alta energia gerada pela moagem. Isso resultando em menor teor de fósforo e, consequentemente, de sódio das amostras.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1, após o tratamento com moinho de bolas, os amidos nativos (MM e PM) apresentaram maior redução do teor de fósforo (APC) do que os amidos fosfatados (CF+M e P+M). Este fato pode estar relacionado com a introdução de novas ligações pois, além das ligações covalentes endógenas existentes entre os grupos fosfato e o amido nativo (BLENNOW *et al.*, 2002; NODA *et al.*, 2006), a introdução de novos grupos fosfato reforça as ligações de hidrogênio nos grânulos (HEO *et al.*, 2017). A carga negativa mais forte nos grânulos de amido (WONGSAGONSUP *et al.*, 2005) e a nuvem eletrônica formada em torno dessas ligações (BATISTA; SILVA; LIBERATO, 2010) podem ter reduzido o efeito da energia gerada pelo moinho de bolas na quebra dessas ligações.

Este mesmo fato pôde ser observado ao comparar-se as fontes botânicas. É possível observar que o amido de milho fosfatado (MF), que apresentou o maior grau de substituição, apresentou a menor redução do teor de fósforo após a moagem. Isso pode estar relacionado ao fato de que quanto mais fósforo é introduzido nas cadeias de amido, mais força essas ligações têm. Desta forma, houve um menor impacto da ação do moinho de bolas na redução do fósforo ligado ao amido.

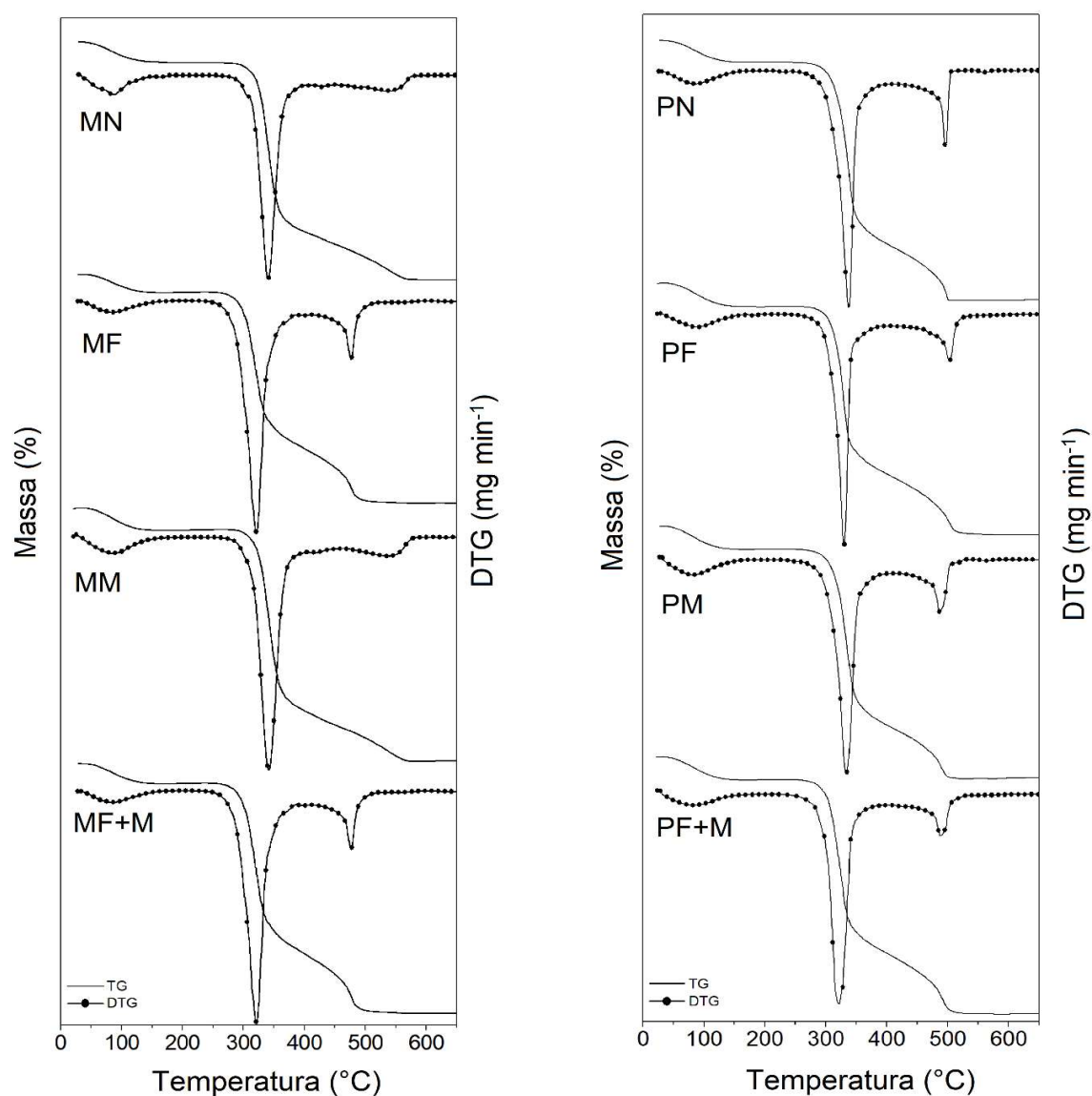
4.3.2 Termogravimetria e Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

As curvas TG/DTG (Figura 4.2) mostraram três perdas de massa. A primeira é associada à desidratação, a segunda à decomposição dos macronutrientes e a última à oxidação da matéria orgânica (BENINCA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

A umidade das amostras variou entre 7,82 % e 8,80 % e a faixa de temperatura (ΔT) de perda de massa nesse primeiro evento térmico ocorreu entre 30 e 163 °C (Tabela 4.2). Os menores valores de temperatura final (T_f) na etapa de desidratação (1º evento térmico) foram verificados para amidos duplamente modificados (MF+M e PF+M), o que demonstra sua menor capacidade de retenção de água durante o aquecimento controlado promovido pela análise TG.

O amido de pinhão nativo apresentou menor estabilidade térmica (E) que o amido de milho nativo, verificado pela menor T_f no estágio de estabilidade térmica (E). Após tratamentos isolados (fosfatação e moinho de bolas), o amido de milho apresentou menor estabilidade térmica que o amido de pinhão, e degrada em menor intervalo de temperatura (ΔT) durante o aquecimento.

Figura 4.2 - Curvas TG/DTG dos amidos de milho (M, à esquerda) de pinhão (P, à direita): nativo (N), fosfatado (F), tratado com moinho de bolas (M) e duplamente modificado (F+M)



Liu *et al.* (2014) e Singh e Nath (2012) verificaram que a reticulação pode melhorar a estabilidade granular com novas ligações covalentes, proporcionando propriedades funcionais desejadas. No entanto, o amido de milho, que apresentou maior grau de substituição (Tabela 4.1), apresentou menor estabilidade térmica. Segundo Wongsagonsup *et al.* (2014), os grupos fosfato na região amorfa dos grânulos reticulados facilitariam sua decomposição térmica.

Tabela 4.2 - Resultados TG/DTG dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados

Evento térmico	MN	MF	MM	MF+M	PN	PF	PM	PF+M
1 ^a Ti - Tf (°C)	30-156	30-162	30-157	30-143	30-161	30-160	30-163	30-156
ΔT (°C)	126	132	127	113	131	130	133	126
Δm (%)	7,82	8,42	8,51	7,94	8,22	8,74	8,75	8,80
E Ti - Tf (°C)	156-269	162-247	157-247	143-240	161-263	160-264	163-256	156-238
ΔT (°C)	113	85	90	97	102	104	102	82
2 ^a Ti - Tf (°C)	269-402	247-390	247-446	240-397	263-412	264-392	256-420	238-403
ΔT (°C)	133	145	199	157	149	128	164	165
Δm (%)	68,67	62,07	74,40	67,56	67,79	64,12	69,54	67,15
3 ^a Ti - Tf (°C)	402-584	390-532	446-581	397-522	412-525	392-540	420-531	403-536
ΔT (°C)	182	140	135	125	113	148	111	133
Δm (%)	19,41	24,36	14,30	22,47	20,35	23,01	18,27	22,87
Cinzas % (m/m)	4,10	5,15	2,79	2,03	3,64	4,13	3,44	1,18

Legenda: Ti, temperatura inicial; Tf, temperatura final; ΔT = Tf-Ti (intervalo de temperatura); Δm, perda de massa (%); E, estabilidade. Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M).

Após a moagem (MM e PM) foi observada uma diminuição na Tf do estágio de estabilidade térmica (E) em relação ao amido nativo (MN e PN, respectivamente). Isso pode estar associado aos fragmentos de baixo peso molecular formados pela quebra de moléculas de amido (amilopectina e amilose) durante a moagem (KIM; KIM, 2014), o que reduz a temperatura inicial da decomposição e aumenta a perda de massa (Δm) nessa segunda (2^a) perda de massa. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira *et al.* (2018a).

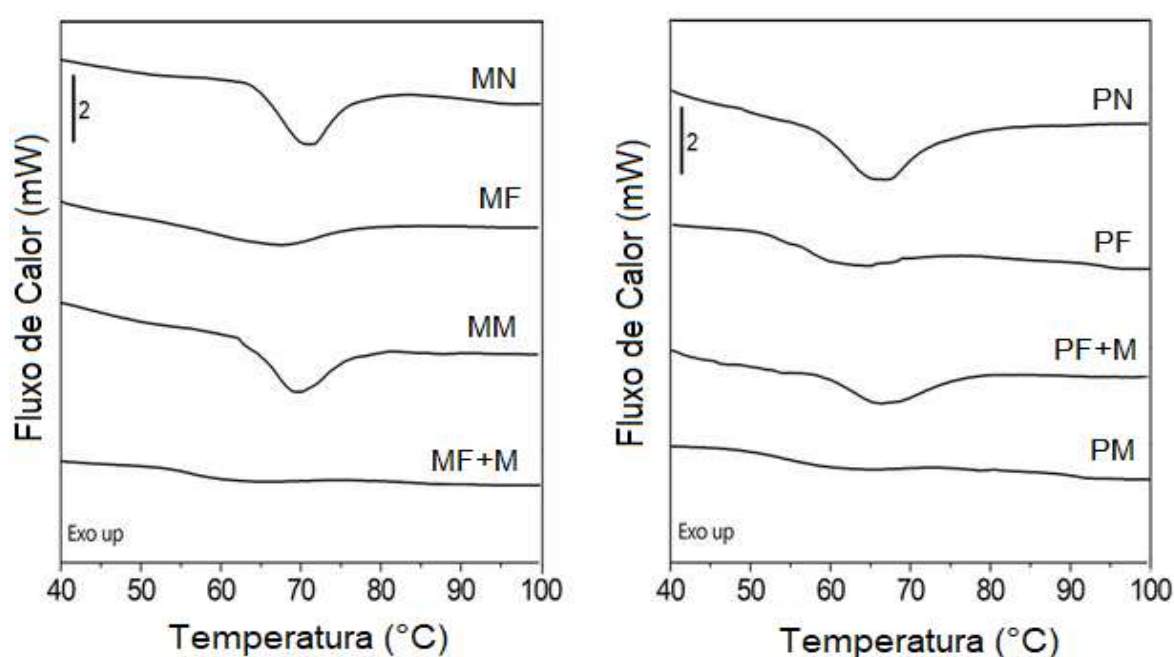
A dupla modificação promoveu uma redução mais pronunciada na estabilidade térmica do amido, mostrando novamente o sinergismo entre as duas modificações empregadas.

Como esperado, o teor de cinzas dos amidos fosfatados é maior do que o dos amidos nativos devido à incorporação de fósforo (ASCHERI; PEREIRA; BASTOS, 2014; BENINCA *et al.*, 2019). Houve redução do teor de cinzas após o tratamento com moinho de bolas. Estes dados corroboraram com os resultados da análise do WDXRF (Tabela 4.1), cujo teor de fósforo e sódio foi menor após o tratamento.

4.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

De acordo com as curvas de DSC (Figura 4.3), os amidos nativos de pinhão e de milho apresentaram picos de gelatinização endotérmicos mais definidos em relação aos amidos fosfatados e moídos. Este perfil foi alterado após as modificações. Segundo Fu *et al.* (2018), picos de gelatinização não bem definidos ocorrem devido à destruição da estrutura cristalina do amido após tratamento com moinho de bolas.

Figura 4.3 - Curvas DSC dos amidos de milho (M, à esquerda) de pinhão (P, à direita): nativo (N), fosfatado (F), tratado com moinho de bolas (M) e duplamente modificado (F+M).



A gelatinização é uma transição de fase que ocorre na presença de excesso de água e calor. Esse processo começa na região amorfa e se estende até a região cristalina do grânulo, quebrando a dupla hélice (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015). A Tabela 4.3 mostra as temperaturas e energia envolvidas no processo de gelatinização.

A fosfatação reduziu as temperaturas iniciais de gelatinização (T_0), fazendo com que a faixa de temperatura de gelatinização (ΔT) aumentasse. Esta menor temperatura de transição pode estar relacionada a um baixo grau de cristalinidade e baixa resistência da estrutura granular à gelatinização (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015). Além disso, a fosfatação aumenta a capacidade de hidratação da fase amorfa no grânulo, reduzindo também a energia necessária para sua gelatinização (ΔH) (BENINCA *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2013).

Tabela 4.3 - Resultados DSC dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados

Amostra	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔT (°C)	ΔH _{gel} (J g ⁻¹)	GD (%)
MN	64,14 ±0,21 ^a	70,48 ±0,26 ^a	76,15 ±0,20 ^a	12,01 ±0,15 ^e	8,77 ±0,13 ^a	-
MF	54,66 ±0,66 ^c	67,09 ±0,10 ^c	75,12 ±0,22 ^b	20,47 ±0,49 ^b	4,35 ±0,14 ^e	50,36
MM	64,01 ±0,05 ^a	69,23 ±0,00 ^b	76,63 ±0,58 ^a	12,61 ±0,62 ^e	7,49 ±0,40 ^b	14,58
MF+M	53,19 ±0,03 ^d	61,98 ±0,10 ^f	73,69 ±0,32 ^{cd}	20,50 ±0,32 ^b	2,21 ±0,05 ^g	74,82
PN	59,70 ±0,08 ^b	66,62 ±0,10 ^d	73,42 ±0,13 ^d	13,72 ±0,07 ^d	6,83 ±0,05 ^c	-
PF	53,99 ±0,15 ^{cd}	61,79 ±0,09 ^f	68,97 ±0,08 ^e	14,98 ±0,18 ^c	3,37 ±0,09 ^f	50,68
PM	58,64 ±0,69 ^b	64,70 ±0,00 ^e	74,55 ±0,61 ^{bc}	15,91 ±0,21 ^c	5,64 ±0,25 ^d	17,32
PF+M	49,89 ±0,98 ^e	61,35 ±0,09 ^g	74,33 ±0,36 ^{bcd}	24,43 ±0,63 ^a	3,01 ±0,04 ^f	55,96

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Legenda: Temperaturas de início (T_o), de pico (T_p) e de conclusão (T_c).; ΔT = T_c-T_o – range ou intervalo de gelatinização; ΔH_{gel} - entalpia de gelatinização; GD - grau de gelatinização. Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M).

Embora em menor extensão, resultados similares foram observados para a ΔH_{gel} dos amidos tratados com moinho de bolas (PM e MM). A redução da entalpia de gelatinização se deve, provavelmente, ao dano causado à estrutura cristalina do amido que promove um aumento na capacidade de inchamento do grânulo, facilitando a formação do gel (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015; SANTOS *et al.*, 2019). Esses resultados podem ser confirmados pela diminuição da cristalinidade relativa dos grânulos, conforme verificado pela análise de DRX (Tabela 4.4). Além disso, devido às forças de atrito, a temperatura do amido pode aumentar durante a moagem (SHI *et al.*, 2015), induzindo uma gelatinização parcial dos grânulos (FU *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018b). Dessa forma, o amido moído exige menos energia para a formação de gel durante a análise de DSC. Moraes; Alves e Franco (2013) relataram que a degradação da área cristalina e a gelatinização parcial dos grânulos é resultado da quebra de ligações α-1,6 e ligações de hidrogênio das moléculas de amido.

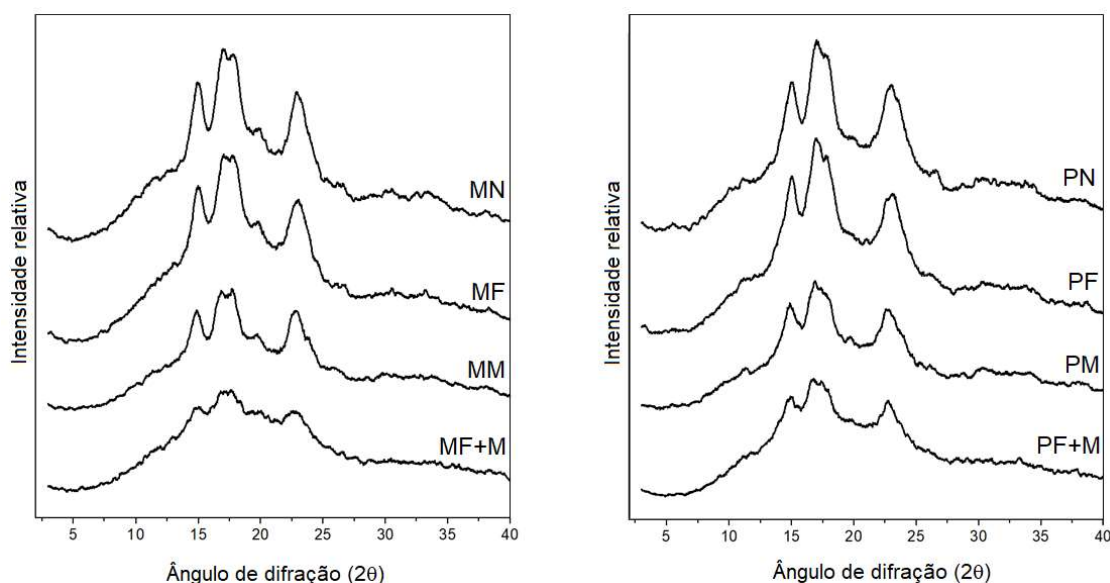
Diferenças mais pronunciadas no ΔT e na ΔH_{gel} foram observadas para os amidos duplamente modificados. Após a dupla modificação dos amidos de milho e de pinhão, a temperatura inicial de gelatinização (T_o) foi reduzida em torno de 10 °C em relação aos nativos causando um aumento proporcional no ΔT. O menor valor para ΔH_{gel} também foi obtido após a dupla modificação. O grau de gelatinização (GD) calculado (Tabela 4.3) mostrou que houve uma diminuição de aproximadamente 75 % da ΔH_{gel} do amido de milho duplamente modificado em comparação ao amido nativo, enquanto que o amido de pinhão apresentou 56 % de redução deste valor. Esses resultados sugeriram uma sinergia entre os tratamentos, afetando drasticamente a estrutura do amido, levando assim a uma maior redução de T_o e ΔH_{gel}.

Os resultados de DSC do amido de milho foram os mais afetados pela dupla modificação (MF+M). De acordo com a Tabela 4.1, o amido de milho apresentou o maior grau de substituição (DS) e teor fósforo (%) após os tratamentos. Na ordem em que a dupla modificação foi realizada, primeiramente foram inseridas ligações com fósforo, que ocorrem principalmente na região amorfa do grânulo (KOO; LEE; LEE, 2010; SHI *et al.*, 2013). Na sequência, o tratamento com moinho de bolas destruiu parte da região cristalina do grânulo (FU *et al.*, 2019) contribuindo para aumentar a proporção de área amorfa (MORAES; ALVES; FRANCO, 2013). Assim, uma vez que a gelatinização inicia na área amorfa do grânulo, é possível que a absorção de água durante o aquecimento, facilitada pela inserção de grupos fosfato no amido, tenha se tornado ainda mais facilitada devido ao aumento da região amorfa, diminuindo mais intensamente a entalpia necessária para a formação de gel. Essa informação está de acordo com os resultados de DSC (Tabela 4.3) e de cristalinidade relativa (Tabela 4.4).

4.3.4 Difratomia de raios X pelo método do pó (DRX)

O padrão de difração de raios X geralmente é classificado em tipo -A, -B ou -C, de acordo com a organização da dupla hélice nos grânulos de amido. O padrão do tipo AV também pode existir no amido (PRATIWI; FARIDAH; LIOE, 2018). Os difratogramas de DRX dos amidos de pinhão e milho nativos e fosfatados, antes e após o tratamento com moinho de bolas estão apresentados na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Padrões de difração de raios X dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados



Legenda: Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M).

O amido de pinhão nativo apresentou um dublete em 2θ de 17° e 18° e picos largos em torno de 15° e 23° , o que o classifica no tipo A. Entretanto, também apresentou picos de difração fracos em torno de $5,5^\circ$ (2θ), típicos dos amidos do tipo B. Desta forma, o amido nativo de pinhão é caracterizado como tipo C_A , considerado uma superposição dos tipos A e B (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2018; ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a). O amido de milho nativo foi identificado como padrão de difração do tipo-A, presente principalmente nos amidos de cereais (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015).

Após a fosfatação não houve alteração importante na posição dos picos, mas foi observado um aumento em sua intensidade. Estes resultados estão de acordo com os observados por outros autores (BENINCA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2014). Por outro lado, a moagem reduziu a intensidade dos picos e promoveu mudanças no dublete. O pico a $5,5^\circ$ (2θ) diminuiu após a moagem. Foi observada uma intensidade de difração significativamente reduzida após dupla modificação.

Algumas características dos picos de difração avaliados pela DRX, tais como intensidade, posição e forma, podem ser modificadas de acordo com o tamanho do “cristal” e de sua deformação, assim como defeitos como vacâncias (vazios), deslocamentos e substituições atômicas (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2018).

O amido é composto por uma estrutura com regiões amorfas (amilose) e semicristalinas (amilopectina), sendo estas últimas compreendidas por lamelas cristalinas e amorfas alternadas (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015; FU *et al.*, 2019; PRATIWI; FARIDAH; LIOE, 2018). Esta cristalinidade relativa (CR) dos amidos, calculada a partir do difratograma de raios X, usualmente varia de 20 a 40 % (WATERSCHOOT *et al.*, 2015). o amido nativo de pinhão apresentou maior CR que o amido de milho (Tabela 4.4). Resultados semelhantes foram apresentados no capítulo anterior.

Tabela 4.4 - Cristalinidade relativa (CR) dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados

Amostra	Cristalinidade Relativa (%)
MN	$21,7 \pm 0,37^c$
MF	$25,7 \pm 0,21^a$
MM	$20,9 \pm 0,54^c$
MF+M	$12,7 \pm 0,74^f$
PN	$24,2 \pm 0,86^b$
PF	$26,9 \pm 0,29^a$
PM	$19,4 \pm 0,39^d$
PF+M	$14,8 \pm 0,12^e$

Legenda: Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M).

A fosfatação aumentou a CR dos amidos nativos. Os grupos fosfato inseridos nas cadeias de amido são possivelmente concentrados principalmente nas regiões amorfas dos grânulos de amido [Liu 2014]. Assim, este tratamento não destruiu a estrutura dos grânulos de amido, mas promoveu uma matriz cristalina mais ordenada do que a do amido nativo. Como consequência, houve um aumento na CR, sem alterar os padrões de cristalinidade. Estes resultados foram confirmados em outros estudos (BENINCA *et al.*, 2019; KOO; LEE; LEE, 2010; LIU *et al.*, 2014; POLNAYA *et al.*, 2013). No entanto, Singh e Nath (2012) verificaram uma redução no CR após a reticulação por POCl_3 de amido de sago. Eles sugeriram que o amido reticulado apresentava uma região mais amorfa, possivelmente devido à substituição de alguns grupos hidroxila por fosfato.

Por outro lado, houve perda da estrutura cristalina durante a moagem, o que causou uma redução na CR das amostras MM e PM. O amido de milho não foi tão afetado quanto o amido de pinhão. A força mecânica e a alta energia durante a moagem induziram um dano da estrutura cristalina do amido, aumentando a região amorfa e diminuindo a CR, estando de com o observado por Oliveira *et al.* (2018) e Zhang *et al.* (2015).

A redução na cristalinidade relativa foi mais pronunciada após dupla modificação. O dano da estrutura do amido pode estar convertendo-o em um estado não-cristalino (ZHANG *et al.*, 2015b). A maior redução da cristalinidade do amido confirmou a diminuição mais intensa da entalpia de gelatinização (Tabela 4.3).

4.3.5 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

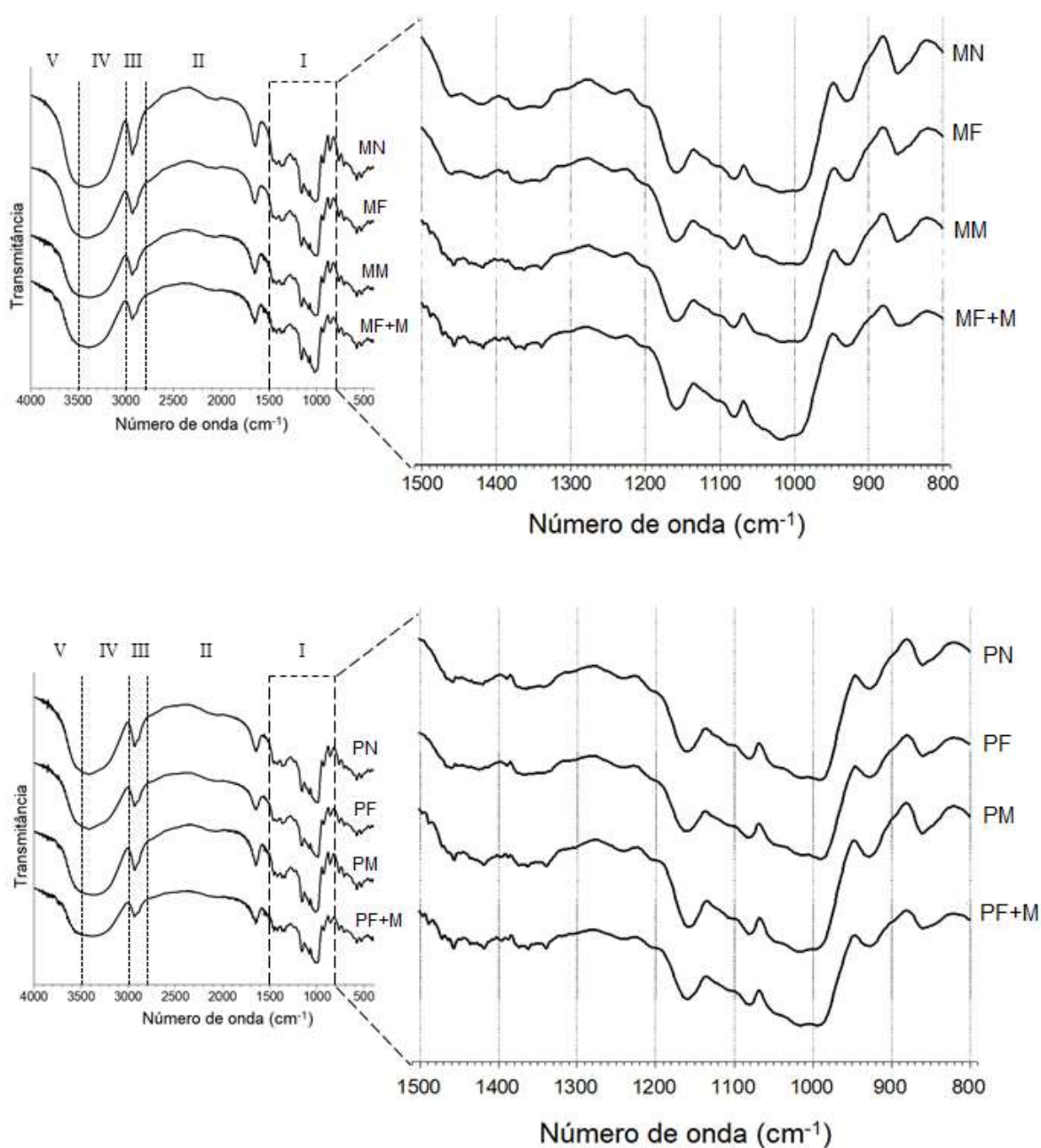
Durante a análise, o raio infravermelho é capaz de penetrar cerca de 2 μm no grânulo. Dessa forma, a organização da estrutura química das cadeias de amido próximas à superfície do grânulo pode ser verificada por FTIR (ZENG *et al.*, 2015).

Com o intuito de facilitar a apresentação dos resultados, os espectros de FTIR dos amidos, obtidos na região de 400 a 4000 cm^{-1} , foram divididos em cinco regiões, conforme demarcadas na Figura 4.6 (à esquerda). Cada região está relacionada à absorção de alguns grupos funcionais, que auxiliam na identificação de compostos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Os picos localizados na região I ($< 800 \text{ cm}^{-1}$) estão localizados nas mesmas posições para ambos os amidos (milho e pinhão) e não se alteraram após as modificações. Esta região corresponde às vibrações esqueléticas do anel de piranose na unidade de glicose dos amidos (KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002). Sechi e Marques (2017) atribuíram o pico em 762 cm^{-1} ao estiramento C-C.

De uma forma geral, os espectros apresentaram poucas diferenças entre si, sendo as maiores alterações observadas na região II (800-1500 cm^{-1}). Nesta região (Figura 4.6, à direita), cada substância apresenta um padrão específico de bandas de absorção, e por isso é denominada região de impressão digital (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Figura 4.5 - Espectros de FTIR dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados.



Nota: O espectro de FTIR à esquerda representa a região estudada (4000–400 cm^{-1}) e à direita a região de impressão digital (1500–800 cm^{-1}) de amidos.

Legenda: Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M).

Os dados experimentais dos picos observados na Região II, em comparação com dados de outros autores, estão apresentados na Tabela 4.5, que está subdividida em duas partes: os dados apresentados na parte superior da linha pontilhada estão relacionados às características normalmente observadas para amidos, e na parte inferior aos amidos fosfatados.

Tabela 4.5 - Bandas FTIR na região de impressão digital do amido (região II)

Número de onda (cm ⁻¹)		Grupo Funcional / Atribuição	Referência*
Dados experimentais	Relatado por outros autores		
860	860	deformações CH ₂	[1,2]
927 a 929	930	deformações CH ₂	[3,4]
	927-931	C-C-H, O-C-H, C-O-C	[2]
Não observado	967	estiramento C-O	[5]
989 a 995	993	deformações C-OH	[4]
1014 a 1016	1018	estiramento C-O	[5]
	1020-1080	C-O-C; C-O-H, ligação glicosídica	[2]
1046-1048 (fraco)	1067	vibração de deformação angular (<i>bending</i>) C-H	[3]
1080-1082	1082	C-O, C-C	[1,4,6]
	1082	Não foi observado	[3]
1106-1108 (fraco)	1094	C-O-H (<i>bending</i>)	[3]
1157-1159	1159, 1150	C-O-C, ligação glicosídica α-(1→4)	[1,6]
	1159		[4]
	1151-1161	C-O; C-C; C-O-H	[2]
1238-1242	1242	deformações CH ₂	[1]
	1240-1242	CH ₂ OH	[2]
1458, 1460, 1456	1460	deformações CH ₂	[1]
	1450	impurezas (proteínas)	[7]
	1400-1456	C-O; C-H; H-C-H	[2]
Não observado	889	P-O	[4]
Não observado	950	estiramento P-O-C	[8]
1048-1050	1055	estiramento P-O-C	[8,9]
Não observado	1090	P-O-C	[5]
1106-1108 (fraco)	1129	estiramento simétrico e assimétrico do grupamento PO ₂	[4]
1157-1159	1150-1400	P=O	[9]
Não observado	1172	estiramento P=O	[8]
1203-1207 (fraco)	1214	estiramento simétrico P=O	[4]
	1231	P=O	[5]

*[1] Iurckevicz; Marques; Lima, 2017; [2] Bet *et al.*, 2019; [3] Kizil; Irudayaraj; Seetharaman, 2002; [4] Sechi; Marques, 2017; [5] Singh; Nath, 2012; [6] LIU *et al.*, 2011; [7] Delval *et al.*, 2004; [8] Polnaya; Marseno; Cahyanto, 2018; [9] Liu *et al.*, 2014.

Esta região apresentou bandas mais complexas e em maior quantidade pois, além das bandas relacionadas às características intrínsecas do amido, é nessa região que estão as bandas relacionadas às ligações do fósforo (IURCKEVICZ; MARQUES; LIMA, 2017; KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002; LIU *et al.*, 2014; POLNAYA; MARSENO; CAHYANTO, 2018; SECHI; MARQUES, 2017).

Algumas bandas características do TPS foram relacionadas por Silverstein, Webster e Kiemle (2007) e estão localizadas região de impressão digital do amido: (a) entre 520 e 665 cm^{-1} , devido ao alongamento assimétrico das ligações P=O, (b) a 895 cm^{-1} a banda é atribuída ao estiramento vibracional assimétrico do grupo POP, e (c) as bandas de 1210 cm^{-1} relacionadas ao estiramento simétrico de P=O.

As bandas verificadas entre 1157-1159 cm^{-1} estão simultaneamente relacionadas com ligações C-O-C (IURCKEVICZ; MARQUES; LIMA, 2017; LIU *et al.*, 2014; SECHI; MARQUES, 2017) e com as ligações P=O (LIU *et al.*, 2014). Dessa forma, a atribuição exata das bandas e suas respectivas intensidades na região II foram dificultadas devido à possível sobreposição de bandas características do amido e ao baixo nível de fosfatação (GAO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2009; SECHI; MARQUES, 2017; XIE *et al.*, 2019).

O tratamento com moinho de bolas promoveu leves alterações nos espectros de FTIR, estando de acordo com o observado por outros autores (LIU *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018b; ROA *et al.*, 2014). No entanto, a moagem afetou a característica das bandas entre 1340 e 1500 cm^{-1} (região CH_2). Os picos em torno de 1460, 1420, 1340 e 1360-1370 cm^{-1} apresentaram-se mais definidos para amostras tratadas com moinho de bolas (MM e PM). Um pico a 1488 cm^{-1} foi observado apenas para estas amostras.

O amido de milho duplamente modificado apresentou pico mais intenso a 1016 cm^{-1} (C-O) e menos intenso a 860 cm^{-1} (CH_2). Além disso, a faixa de 1048 cm^{-1} também foi menos acentuada.

Liu *et al.* (2011) sugeriram que o aumento no tempo de moagem destruiu a estrutura ordenada (1047 cm^{-1}) e aumentou a estrutura amorfa (aumento da intensidade da banda em 1018 cm^{-1}) do amido de milho. Efeito semelhante foi verificado por Roa *et al.* (2014), cujos resultados dos espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) mostraram que as razões de intensidade das bandas correspondentes às regiões cristalina/amorfa do amido (1039/1014 cm^{-1}) diminuíram após o tratamento com moinho de bolas.

A região III é conhecida como região de flexão das ligações O-H, sendo a banda a 1642 cm^{-1} relacionada à presença de água adsorvida na região amorfa dos grânulos de amido

(DELVAL *et al.*, 2004; IURCKEVICZ; MARQUES; LIMA, 2017; KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002; LIU *et al.*, 2011; SECHI; MARQUES, 2017). Liu *et al.* (2014) afirmaram que a quebra das ligações de hidrogênio intramoleculares tornou esse pico mais acentuado para o amido de milho reticulado em relação ao amido de milho nativo, confirmando os resultados da reticulação com o trimetafosfato de sódio (STMP). Kizil; Irudayaraj e Seetharaman (2002) atribuíram as bandas mais nítidas em torno de 1642 cm^{-1} à cristalinidade do amido. Para eles, as bandas de amido polimorfo do tipo B são mais nítidas que os do tipo A.

Neste estudo, a banda de 1637 cm^{-1} para o amido de pinhão nativo (PN) não se alterou após a fosfatação (PF), mas migrou para um número de onda mais alto (1652 cm^{-1}) após a moagem (PM). O mesmo ocorreu para o amido de milho ($1641 \rightarrow 1652\text{ cm}^{-1}$).

Na região IV, entre 2800 e 3000 cm^{-1} , a banda a 2930 cm^{-1} foi verificada para todas as amostras. Ela está relacionada ao estiramento C-H, comum das estruturas glicosídicas (IURCKEVICZ; MARQUES; LIMA, 2017; SECHI; MARQUES, 2017; SINGH; NATH, 2011). A intensidade das bandas nesta região diminuiu principalmente para amidos duplamente modificados. Segundo Kizil, Irudayaraj e Seetharaman (2002), a variação na quantidade de amilopectina e amilose podem promover mudanças de intensidade neste intervalo (2800 - 3000 cm^{-1}). Desta forma, essas informações corroboram com a mudança na cristalinidade relativa verificada pelo DRX (Tabela 4.4).

Uma pequena alteração foi encontrada entre as amostras na Região V (3000 a 3600 cm^{-1}), a qual corresponde à vibração do grupo hidroxila (O-H) (BET *et al.*, 2019; DELVAL *et al.*, 2004; SINGH; NATH, 2011). Liu *et al.* (2011) também atribuíram a banda a 3382 cm^{-1} ao estiramento dos grupos hidroxila do amido de milho. Sechi e Marques (2017) verificaram uma banda a 3630 cm^{-1} , possivelmente relacionada à água livre adsorvida na superfície da amostra.

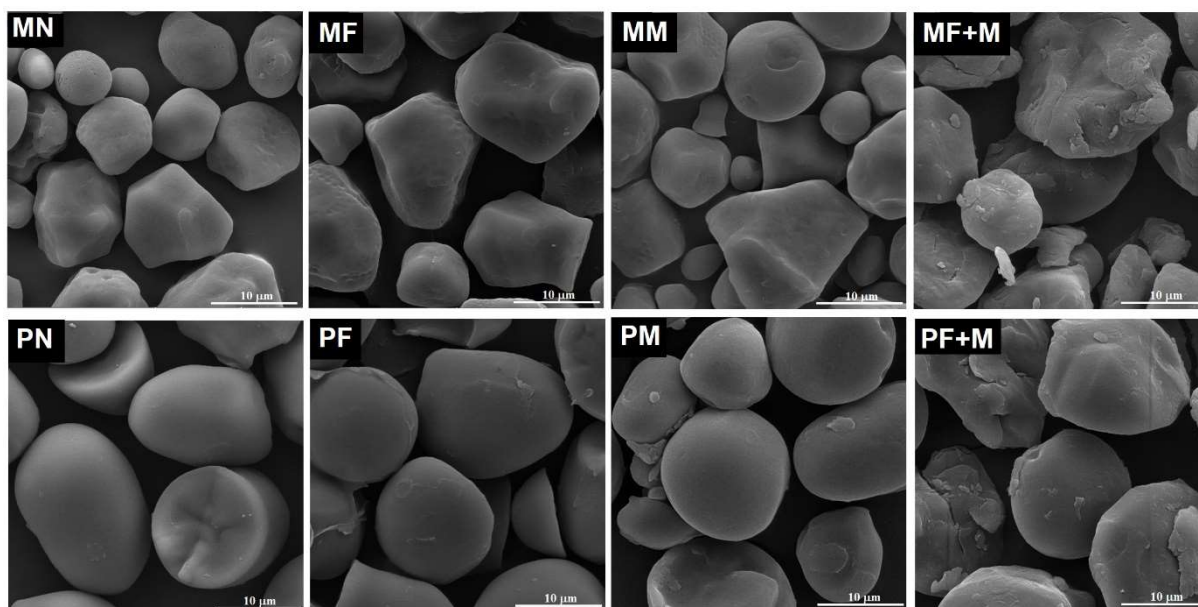
Xie *et al.* (2019) estudaram a ligação cruzada com trimetafosfato de sódio em amidos de trigo porosos. Eles verificaram que os picos a aproximadamente 3400 cm^{-1} se tornaram mais amplos, devido ao fato de que os grupos fosfato foram introduzidos formando pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila.

Os dados de FTIR demonstram que a moagem promoveu mais alterações na estrutura dos amidos nativos em relação aos fosfatados. A interação com grupos fosfato parece fortalecer as ligações de hidrogênio no amido, protegendo a sua estrutura contra danos mais intensos quando a moagem é aplicada posteriormente. Porém, ligações mais externas são mais afetadas durante a moagem, impactando na redução do teor de fósforo (Tabela 4.1), da estabilidade térmica (Tabela 4.2), da entalpia de gelatinização (Tabela 4.3) e da cristalinidade relativa (Tabela 4.4).

4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

As microimagens dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, moídos e duplamente modificados estão mostradas na Figura 4.6.

Figura 4.6- Microimagens dos amidos de milho e de pinhão nativos, fosfatados, tratado com moinho de bolas e duplamente modificados.



Legenda: Amido de milho nativo (MN), fosfatado (MF), moído (MM) e duplamente modificado (MF+M); Amido de pinhão nativo (PN), fosfatado (PF), moído (PM) e duplamente modificado (PF+M).

A forma do amido de milho nativo (MN) mostrou-se poligonal enquanto o amido de pinhão nativo (PN) apresentou uma mistura de formato oval e arredondado. Em geral, o amido de pinhão apresenta grânulos maiores que o amido de milho. No entanto, estas duas fontes botânicas de amido apresentam grânulos de tamanhos variados. A superfície do amido de pinhão apresentou depressões enquanto alguns grânulos de amido de milho apresentam poros, conforme apresentado no capítulo anterior.

Nenhuma alteração morfológica perceptível foi observada para ambas as amostras após a fosfatação (MF e PF). Estes resultados estão de acordo com o capítulo anterior e com outros estudos para amido de milho (KOO; LEE; LEE, 2010) e amido de arroz (REN; SHIN, 2013; SONG; PARK; SHIN, 2011) usando STMP/STPP (99/1 % m /m). O POCl_3 em diferentes concentrações não promoveu alterações na morfologia do amido de batata [KAUR, 2006]. No entanto, um aumento no tamanho das partículas devido à formação de aglomerados, perda das características externas (superfície lisa) e da integridade estrutural dos grânulos foi observado para amidos de diferentes fontes botânicas modificadas por STTP (SECHI; MARQUES, 2017), STTM (SECHI; MARQUES, 2017) e POCl_3 (SINGH; NATH, 2011; SINGH; NATH, 2012).

O moinho de bolas parece promover redução no tamanho da maioria dos grânulos de milho e pinhão, mas mantendo a integridade de parte deles (Figura 4.6, MM e PM). Liu *et al.* (2011) mostraram que com maiores tempos de tratamento, o moinho de bolas promoveu um efeito mais intenso nas características morfológicas dos grânulos de amido. Normalmente, os grânulos são ‘descascados’ por camadas, o que reduz seu tamanho (LIU *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018b). Além disso, as pequenas partículas podem aderir à superfície dos grânulos maiores, aglutinar-se ou formar pedaços (HE *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2011).

Os amidos de milho e pinhão fosfatados submetidos ao tratamento com moinho de bolas (MF+M e PF+M) apresentaram alterações em sua aparência. Foi possível verificar a formação de fissuras e erosão na superfície dos grânulos e adesão de pequenas partículas às grandes. Fu *et al.* (2019) promoveram um tratamento ácido-alcoólico em amido de batata previamente tratado com moinho de bolas e verificaram que as erosões promovidas no grânulo favorecem o ataque ácido.

De acordo com Fu *et al.* (2019), o exterior dos grânulos é composto de estruturas fortemente compactadas, formadas de pelos aglomerados de cadeias laterais de amilopectina e grande parte da estrutura amorfa está localizada no interior dos grânulos. Portanto, a perda de integridade superficial do grânulo pode estar relacionada à desestruturação da estrutura cristalina do amido (SINGH; NATH, 2012), verificada pela redução da cristalinidade relativa pela análise de DRX (Tabela 4.4).

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados da espectroscopia por dispersão de raios X por comprimento de onda confirmaram a introdução dos grupos fosfato aos amidos de milho e de pinhão. O tratamento com moinho de bolas promoveu redução do teor de fósforo e sódio nas amostras nativas e fosfatadas. Seu efeito foi mais pronunciado nos amidos nativos.

Foram verificadas alterações nas propriedades térmicas dos amidos de milho e de pinhão após as modificações química e física realizadas de forma isolada. No entanto, os amidos duplamente modificados apresentaram maior diferença na estabilidade térmica e na entalpia de gelatinização.

Os padrões de DRX não foram alterados após as modificações. A cristalinidade relativa aumentou após a fosfatação e diminuiu após tratamento com moinho de bolas. Os amidos de milho e de pinhão duplamente modificados foram novamente os que apresentaram maiores alterações estruturais, também verificados pelos espectros de FTIR.

A fosfatação não alterou as características morfológicas dos amidos das duas fontes botânicas avaliadas. Ao contrário, a moagem promoveu uma descamação das amostras, com redução do tamanho e adesão das partículas descamadas aos grânulos.

Assim, algumas alterações foram observadas nas propriedades térmicas, estruturais e morfológicas dos amidos de milho e de pinhão após as modificações realizadas de forma isolada. No entanto, os resultados das análises de WDRXF, TG/DTG, DSC, DRX, FTIR e FEG-MEV, apontaram que a dupla modificação, ou seja, a fosfatação seguida de moagem, promoveu alterações mais intensas nestas características.

CAPÍTULO 5 - EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DA CASCA DE PINHÃO NAS PROPRIEDADES DOS AMIDOS DE MILHO E PINHÃO

O conteúdo deste capítulo está publicado na revista
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry:

Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts from Pinhão Coats on the Properties of Corn and *Pinhão* Starches

Cleoci Beninca, Radla Zabian Bassetto Bisinella, Camila Delinski Bet, Cristina Soltovski de Oliveira,
Raíssa Arantes Barboza, Tiago André Denck Colman, Ivo Mottin Demiate, Egon Schnitzler

(DOI 10.1007/s10973-019-08811-7)

RESUMO

A semente de *Araucaria angustifolia*, denominada pinhão, possui alto teor de carboidratos e é considerada uma fonte de amido não convencional. Suas cascas são ricas em compostos fenólicos, que podem ser facilmente extraídos com diferentes solventes. Este estudo apresenta métodos de extração aquosa e etanólica de compostos fenólicos de cascas de pinhão e sua incorporação em amidos de milho e pinhão. Termogravimetria, Calorimetria Exploratória Diferencial, Difractometria de Raios X pelo método do pó, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier e Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo foram aplicadas para avaliar as propriedades térmicas, estruturais e morfológicas dos amidos. As amostras controle foram preparadas nas mesmas condições, com água deionizada e etanol:água 55:45 v/v, sem extratos. Os amidos incorporados com os extratos apresentaram menores temperaturas de decomposição térmica que os nativos. A entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}) do amido de milho diminuiu após incorporação com extratos. A ΔH_{gel} do amido de pinhão nativo foi de 7,3 J g⁻¹. Observou-se maior ΔH_{gel} após o tratamento com extrato etanólico, enquanto o extrato aquoso causou diminuição desse valor. Os tratamentos não alteraram os padrões de difração, mas alteraram a cristalinidade relativa (CR) dos amidos, exceto as amostras tratadas com etanol:água 55:45 v/v que mantiveram a CR semelhante aos nativos. Houve uma boa correlação dos dados de FTIR com CR e ΔH_{gel} . Após incorporação com extrato etanólico, o amido de pinhão apresentou descamação superficial. Não foi observada alteração nas características morfológicas das demais amostras. Os resultados indicam que existe interação entre os compostos fenólicos das cascas de pinhão e o amido.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*, Compostos fenólicos, Gelatinização, Análise térmica.

ABSTRACT

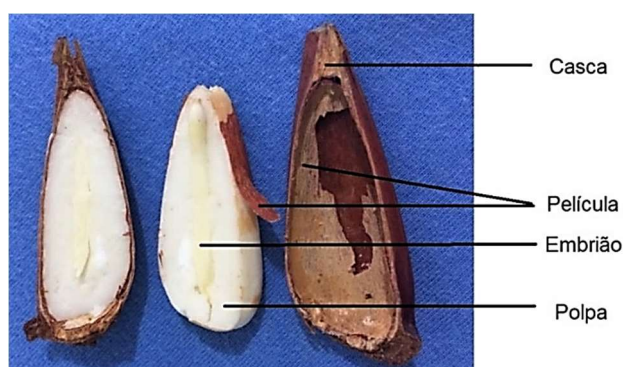
The *Araucaria angustifolia* seed, named *pinhão*, has a high content of carbohydrates and it is considered an unconventional starch source. Its coats are rich in phenolic compounds, which can be easily extracted with some solvents. This study presents a method of aqueous and ethanolic extraction of phenolic compounds from *pinhão* coats and its incorporation into corn and *pinhão* starches. Thermogravimetry, Differential Scanning Calorimetry, X-ray Powder Diffractometry, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Field Emission Gun-Scanning Electron Microscopy were applied to evaluate the thermal, structural and morphological properties of starches. The control samples were prepared under the same conditions, with deionised water and ethanol:water 55:45 v/v, without extracts. Starches incorporated with both extracts showed lower thermal decomposition temperatures than the native ones. The gelatinisation enthalpy (ΔH_{gel}) of corn starch decreased after incorporation with extracts. The ΔH_{gel} of native *pinhão* starch was 7.3 J g⁻¹. It was observed higher ΔH_{gel} after treatment with ethanolic extract while the aqueous extract caused decrease in this value. Treatments did not change the diffraction patterns but change the relative crystallinity (RC) of starches, except to the samples treated with ethanol:water 55:45 v/v that maintained RC similar to the native ones. There was a good correlation of FTIR data with RC and ΔH_{gel} . After incorporation with ethanolic extract, the *pinhão* starch showed superficial peeling. No change was observed in morphological characteristics for the other samples. Results indicate that there is an interaction between the phenolic compounds of the *pinhão* coats and the starch.

Keywords: *Araucaria angustifolia*. Phenolic compounds. Gelatinization. Thermal analysis.

5.1 INTRODUÇÃO

A semente de *Araucaria angustifolia*, conhecida como pinhão, é formada por revestimento externo, tegumento interno, amêndoa ou polpa e embrião (Figura 5.1). Sua massa compreende de 7 a 9 g por semente, e a casca representa cerca de 22 % do total (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2011; CORDENUNSI *et al.*, 2004).

Figura 5.1 - Semente de *Araucaria angustifolia*



Fonte: O autor

Estima-se que aproximadamente 10 toneladas de cascas de pinhão sejam descartadas anualmente no Brasil. Devido ao longo período de decomposição, estudos visando uma melhor utilização desse resíduo têm sido realizados (PERALTA *et al.*, 2016).

O alto teor de amido (70 % da massa de amêndoa, base seca) (ZORTÉA-GUIDOLIN *et al.*, 2017a), adicionado ao método simples e de alto rendimento na extração desse polissacarídeo, incentiva seu uso no processamento em uma planta piloto e em escala comercial (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006).

A casca do pinhão é citada como fonte de compostos fenólicos, que possuem propriedades antioxidantes e potencial atividade biológica (FREITAS *et al.*, 2018). As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres, produzindo efeitos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, renais e hepáticas e câncer (BEHLING *et al.*, 2004; DAUDT *et al.*, 2015).

Esses compostos podem migrar das cascas para a amêndoa durante o cozimento em água ou podem ser extraídos na presença de solventes (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; DAUDT *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2018). Extratos metanólicos das cascas da semente de pinhão, obtidos sob sonicação, foram sugeridos para a formulação de produtos cosméticos antienvhecimento devido à presença de biomoléculas antioxidantes (MOTA *et al.*, 2014). O extrato aquoso das cascas de pinhão, uma boa fonte de compostos fenólicos com potencial

atividade antioxidante, foi aplicado para desenvolver formulações cosméticas (DAUDT *et al.*, 2015). Extratos obtidos de misturas de etanol e água em diferentes temperaturas e porcentagem de sólidos (cascas de pinhão) foram avaliados por Santos *et al.* (2018). Dentre as condições testadas, a maior concentração de etanol em relação à água (85 %, v/v), a maior porcentagem de sólidos (12,5 %, m/v) e a menor temperatura (30 °C) promoveram extratos mais ricos em compostos fenólicos totais (71,8 mg g⁻¹).

Pesquisas recentes sugerem que compostos fenólicos podem formar interações não covalentes com o amido, influenciando suas propriedades nutricionais e físico-químicas, como na modulação do índice glicêmico em alimentos amiláceos, além de reduzir sua digestibilidade (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016; SOMARATNE *et al.*, 2017).

Guzar; Ragae e Seetharaman (2012) relataram que a incorporação de extratos de chá preto e verde reduz a hidrólise enzimática e altera as propriedades de pasta de amidos de trigo, milho, batata e arroz, devido às interações amido-composto fenólico.

Os métodos de preparação de extratos, incluindo o tipo e proporção de cada solvente e condições de processo (tempo, temperatura, agitação), a fonte botânica da matriz, sua granulometria e proporção matriz: solvente produzem complexos amido- compostos fenólicos com diferentes características. Além disso, a estrutura, morfologia, proporção de amilose e amilopectina e a organização dos polímeros no grânulo de amido influenciam o grau e a forma de interação entre amido e composto fenólico, diferenciando as propriedades desse novo complexo (GUZAR; RAGAE; SEETHARAMAN, 2012; XIAO *et al.*, 2013; ZHU, 2015b; ZHU *et al.*, 2009).

Ainda são restritas informações sobre a ação de compostos polifenólicos extraídos da casca de pinhão e sua incorporação em matrizes amiláceas. Assim, a casca e o amido de pinhão podem ser utilizados como material para o desenvolvimento de produtos inovadores, uma vez que a demanda por ingredientes naturais, funcionais e nutracêuticos está aumentando.

Os mais variados ramos da indústria estão em grande demanda pela aplicação de amidos, o que mostra a importância da caracterização de amidos de diferentes fontes botânicas (ALCÁZAR-ALAY; MEIRELES, 2015; FARIAS *et al.*, 2014; GRANZA *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2013; LACERDA *et al.*, 2015). O amido extraído do pinhão (semente de *Araucaria angustifolia*) apresenta grande potencial na indústria alimentícia principalmente como espessante e na preparação de embalagem de filme biodegradável, bem como na indústria farmacêutica como excipiente (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; DAUDT *et al.*, 2014; LUCHESE *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015b; SPADA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos compostos presentes nas cascas de pinhão (extraídos em soluções aquosa e etanólica) nas propriedades térmicas, estruturais e morfológicas dos amidos de milho e pinhão.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Araucaria angustifolia* foram coletadas em junho (2017) na Flona. O amido de milho utilizado é comercial (Maiscerta®, lote 16/03/17).

5.2.1 Separação das cascas e do amido das sementes de pinhão

A casca externa e o tegumento interno que circundam as sementes do pinhão foram removidos manualmente, secos em estufa (40 °C, 16 h) e moídos (Ika® Werke, M20) para reduzir o tamanho das partículas e aumentar a área de superfície para extração. O pó obtido foi armazenado em saco plástico em local escuro até o uso (6 meses).

O amido de pinhão foi obtido por extração aquosa, conforme descrito no capítulo 2.

5.2.2 Preparo de extratos aquoso e etanólico das cascas de pinhão

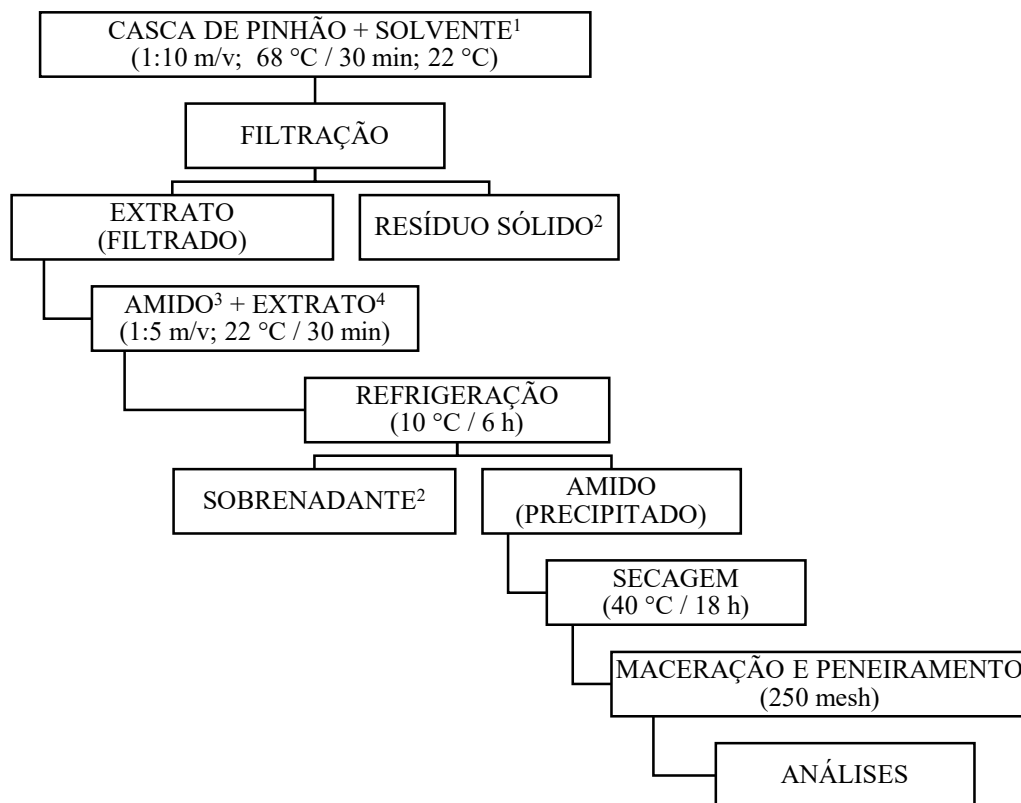
Os extratos foram preparados por adaptações das metodologias propostas por Cladera-Olivera (2008) e Daud *et al.* (2015). As cascas moídas foram submetidas a infusão em solvente (água deionizada ou etanol:água 55:45 v/v) na proporção de 1:10 (casca:solvente). Cada mistura foi aquecida separadamente a 68 °C por 30 min em um banho termostático com agitação, resfriada à temperatura ambiente (~22 °C) e filtrada. Cada extrato foi utilizado separadamente para incorporação no amido.

5.2.3 Incorporação dos extratos em amidos de pinhão e milho

Os extratos (aquoso ou etanólico) foram incorporados ao amido de duas fontes botânicas diferentes, pinhão e milho, como mostra a Figura 5.2. Uma proporção de amido: extrato (1:5, m/v) foi misturada sob agitação magnética constante por 30 minutos à temperatura ambiente (~22 °C). A amostra foi armazenada a 10 °C por 6 h e o sobrenadante foi removido. O amido (precipitado) foi seco em estufa a 40 °C por 18 h e macerado com almofariz e pistilo e peneirado (250 mesh).

As amostras controle para os dois amidos (pinhão e milho) foram preparadas nas mesmas condições, em contato apenas com água deionizada ou etanol:água 55:45 v/v (etanol 55 %), sem a presença dos extratos.

Figura 5.2 - Preparação dos extratos aquoso e etanólico da casca de pinhão e sua incorporação nos amidos de milho e pinhão



¹Etanol 55 % v/v ou água deionizada; ²Descartado; ³ Amido de milho ou pinhão; ⁴ Extrato aquoso ou etanólico. Para produção das amostras controle, os extratos foram substituídos por apenas solvente (etanol 55 % v/v ou água deionizada)

As amostras foram assim denominadas: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eA), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (P-A), extrato aquoso (P-eAq), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

5.2.4 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas com um o equipamento TGA-50 (Shimadzu, Japão), calibrado preliminarmente com massa padrão e testado com padrão oxalato de cálcio monohidratado. A análise foi realizada nas seguintes condições: massa da amostra em torno de 8,0 mg em um cadinho de alumina; taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 650 °C; fluxo de ar de 150 mL min⁻¹. O software TA-60 (Shimadzu, Japão) foi utilizado para obter e interpretar as curvas (BENINCA *et al.*, 2019).

5.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises DSC foram realizadas no equipamento DSCQ200 (TA-Instruments, EUA) nas seguintes condições: massa da amostra de aproximadamente 2,5 mg (suspensão 1:4 de amido:água, m/v) em cadinhos de alumínio selados; fluxo de ar de 50 mL min⁻¹, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 100 °C. O instrumento foi previamente calibrado com índio (99,99 % de pureza, ponto de fusão 156,6 °C, $\Delta H = 28,56 \text{ J g}^{-1}$). O software Universal Analysis foi utilizado para obter temperaturas de gelatinização e entalpias das amostras (BET *et al.*, 2018b).

Para obtenção das microimagens, uma suspensão de amido com água em excesso foi preparada no cadinho de alumínio que permaneceu aberto durante a análise. Um microscópio digital equipado com um sensor CMOS colorido e vidro de lente com resolução de 2 M pixels e uma ampliação de 800 X foi acoplado a célula DSC. O software AMCAP V9.016 foi usado para capturar as imagens. O aquecimento foi realizado a uma taxa de 20 °C min⁻¹, de 30 °C a 400 °C (BISINELLA *et al.*, 2017).

5.2.6 Difratometria de raios X pelo método do pó (DRX)

Os difratogramas de raios X das amostras foram obtidos por difratômetro de raios X (Ultima IV, Rigaku, Japão). Foram utilizados os seguintes parâmetros: radiação CuK α ($\lambda = 1,544 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, velocidade de varredura de 2 min⁻¹, passo de 0,02 e geometria de Bragg-Brentano de $3^\circ < \theta < 40^\circ$ (2 θ). O grau de cristalinidade relativa foi calculado de acordo com a literatura (BET *et al.*, 2018a; COLMAN; DEMIATE; SCHNITZLER, 2014).

5.2.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (IRPrestige21; Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) foi utilizado para caracterizar as amostras. Para a análise, os pellets foram produzidos a partir de 2 mg da amostra (base seca) e 100 mg de KBr seco. Os espectros foram obtidos na resolução de 4 cm⁻¹ e uma média de 64 varreduras na região de 4000-400 cm⁻¹ (DUPUIS *et al.*, 2017).

5.2.8 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

O tamanho e a forma dos grânulos de amido foram avaliados usando o microscópio MIRA 3 (Tescan, República Tcheca). Esta análise foi realizada utilizando uma voltagem eletrônica de 15 kV na pistola de emissão de campo, gerada por um filamento de lâmpada de tungstênio. A imagem foi gerada por elétrons secundários (SE) (BET *et al.*, 2016).

5.2.9 Análise Estatística

O software Action Stat v. 3.3 (Estatcamp, São Paulo, Brasil) foi utilizado para comparação das médias pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) cujas distinções foram verificadas pela Análise de variância (ANOVA).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários compostos químicos podem ser extraídos das cascas de pinhão em diferentes solventes (BRANCO; RODRIGUES, 2016; DAUDT *et al.*, 2015). Freitas *et al.* (2018) obtiveram extratos de casca de pinhão em água, etanol puro e em etanol:água 80:20 (v/v). O teor de fenólicos totais variou de 15 a 20 mg g⁻¹, sendo a menor concentração obtida em etanol puro. A mistura etanol:água promoveu os menores teores de flavonóides e ácidos fenólicos totais em relação aos demais solventes. Devido às diversas classes de compostos fenólicos, não há um método capaz de extraí-los igualmente (KOEHNLEIN *et al.*, 2012).

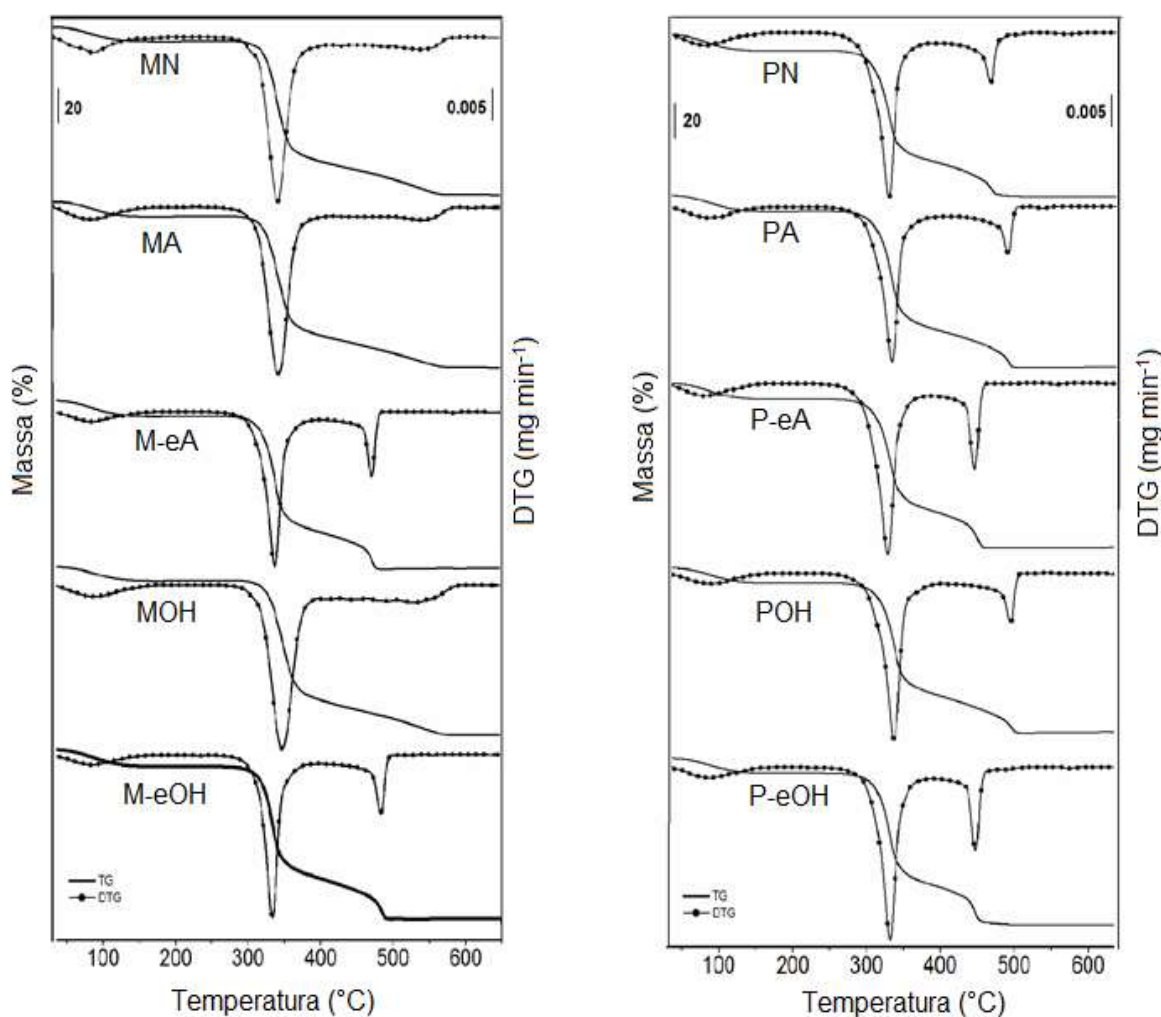
De acordo com os resultados abaixo, o contato entre os amidos de milho e pinhão e os extratos aquoso e etanólico da casca de pinhão promoveu alterações em algumas propriedades.

5.3.1 Termogravimetria (TG)

As amostras apresentaram três etapas de perda de massa, comumente verificados para amidos (BET *et al.*, 2018b; OLIVEIRA *et al.*, 2018a), como mostra a Figura 5.3. A primeira está relacionada à desidratação da amostra, cujo valor de Δm (%) corresponde à umidade da amostra. Então, há um período de estabilidade (E), no qual não há alteração na massa da amostra durante o aquecimento controlado. A segunda perda de massa é devida à decomposição térmica e a terceira à oxidação da matéria orgânica (BENINCA *et al.*, 2019; BET *et al.*, 2018b). No entanto, Chai; Wang e Zhang (2013) relataram curvas de decomposição de etapa única para

amido de milho com alto teor de amilose complexado com polifenóis do chá. Isso ocorreu porque suas amostras foram aquecidas sob um fluxo de gás inerte (nitrogênio), portanto não houve processo oxidativo.

Figura 5.3 - Curvas TG/DTG dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão



Legenda: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eAq), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (PA), extrato aquoso (P-eA), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

As amostras têm um teor de umidade de cerca de 8-10 % (Tabela 5.1). O amido de pinhão nativo apresentou menor estabilidade térmica (272 °C) quando comparado ao amido de milho nativo (291 °C). Resultados semelhantes foram encontrados por Cordoba; Bet e Schnitzler (2015) e Bicudo *et al.* (2009). As demais amostras apresentaram comportamento semelhante, e todas as amostras de amido de milho apresentaram temperatura de estabilidade mais alta que as do pinhão.

Quando os extratos aquoso e etanólico das cascas de pinhão foram incorporados aos amidos, houve uma diminuição na faixa de temperatura ($T_f - T_i$) durante a estabilidade térmica (E) após a desidratação. Para as amostras controle, esse intervalo é um pouco maior que os respectivos amidos nativos.

Tabela 5.1 - Resultados TG/DTG dos amido de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão

Etapa	Δm (%)									
	MN	MA	M-eA	MOH	M-eOH	PN	PA	P-eA	POH	P-eOH
1 ^a	8,0	8,9	9,1	8,3	9,7	9,7	9,1	9,1	8,6	8,6
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ^a	71,0	69,8	66,2	69,9	63,6	67,0	66,8	66,6	66,2	64,7
3 ^a	17,8	17,9	21,5	19,0	24,6	20,0	21,6	21,3	21,9	23,8
Cinzas (%)	3,2	3,3	3,1	2,7	2,1	3,4	2,5	2,9	3,2	2,8
Etapa	T_f (°C)									
	MN	MA	M-eA	MOH	M-eOH	PN	PA	P-eA	POH	P-eOH
1 ^a	114	119	120	121	120	117	123	121	122	121
E	291	298	286	299	288	272	281	269	278	265
2 ^a	414	359	347	363	393	344	349	345	352	345
3 ^a	564	566	475	569	489	482	503	460	506	460
Etapa	T_p (°C)									
	MN	MA	M-eA	MOH	M-eOH	PN	PA	P-eA	POH	P-eOH
1 ^a	86,3	83,7	83,0	87,4	83,5	79,2	85,3	81,7	85,1	89,9
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ^a	340,2	342,0	336,2	346,5	333,2	330,4	334,4	331,4	337,2	330,9
3 ^a	536,1	538,6	469,8	529,3	482,8	468,3	491,4	451,5	494,9	448,0

Δm = perda de massa (%); T_f = Temperatura final (°C) de cada evento térmico; T_p = Temperatura de pico (°C); E = estabilidade

Legenda: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eAq), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (PA), extrato aquoso (P-eA), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

Em comparação com os amidos nativos, a etapa relacionada à decomposição dos amidos (2^a) teve início em temperaturas mais altas nas amostras tratadas com água e etanol 55 %. Já quando os extratos foram incorporados aos amidos, houve uma redução nesse valor.

Chai; Wang e Zhang (2013) relataram que o amido com alto teor de amilose, após a incorporação dos polifenóis do chá, apresentou menor temperatura de decomposição com o aumento da concentração de fenólicos, indicando a formação de um complexo entre a amilose e o composto fenólico através de ligações de hidrogênio.

As temperaturas finais após a oxidação (3^a etapa), para ambos os amidos, também apresentaram o mesmo comportamento, diminuindo para as amostras tratadas com compostos fenólicos e aumentando para as amostras controle, em relação às nativas.

Após a oxidação total da matéria orgânica, o teor de cinzas foi calculado (Tabela 5.1) e variou entre 2,14 e 3,36 % da massa inicial.

Embora seja importante avaliar a estabilidade térmica de amidos para direcionar sua aplicação a processos envolvendo temperatura (HORNUNG *et al.*, 2019), existem poucos estudos sobre termogravimetria aplicada ao amido, principalmente aqueles incorporados com extratos fenólicos. A maioria dos pesquisadores avaliou essa propriedade em filmes à base de amido feitos com a adição de alguns extratos naturais. Gutiérrez e Alvarez (2018) desenvolveram filmes a partir de amido de milho e nano-argilas naturais e modificadas com e sem adição de extrato de mirtilo. O amido termoplástico adicionado ao extrato apresentou menor resistência térmica em relação à amostra controle, possivelmente devido ao efeito plastificante dos extratos polifenólicos que formam ligações de hidrogênio com o amido.

A estabilidade térmica de filmes contendo extrato natural foi relacionada à estrutura química dos antioxidantes incorporados. Lozano-Navarro *et al.* (2018) verificaram que os filmes de quitosana e amido com betalainas e antocianinas (de beterraba, mirtilo e pitaia) são mais estáveis termicamente que timol e carvacrol (de orégano).

Os resultados da análise termogravimétrica indicam que não é apenas o reagente que interfere nas propriedades do amido, mas há uma interação entre o amido e os compostos extraídos das cascas de pinhão.

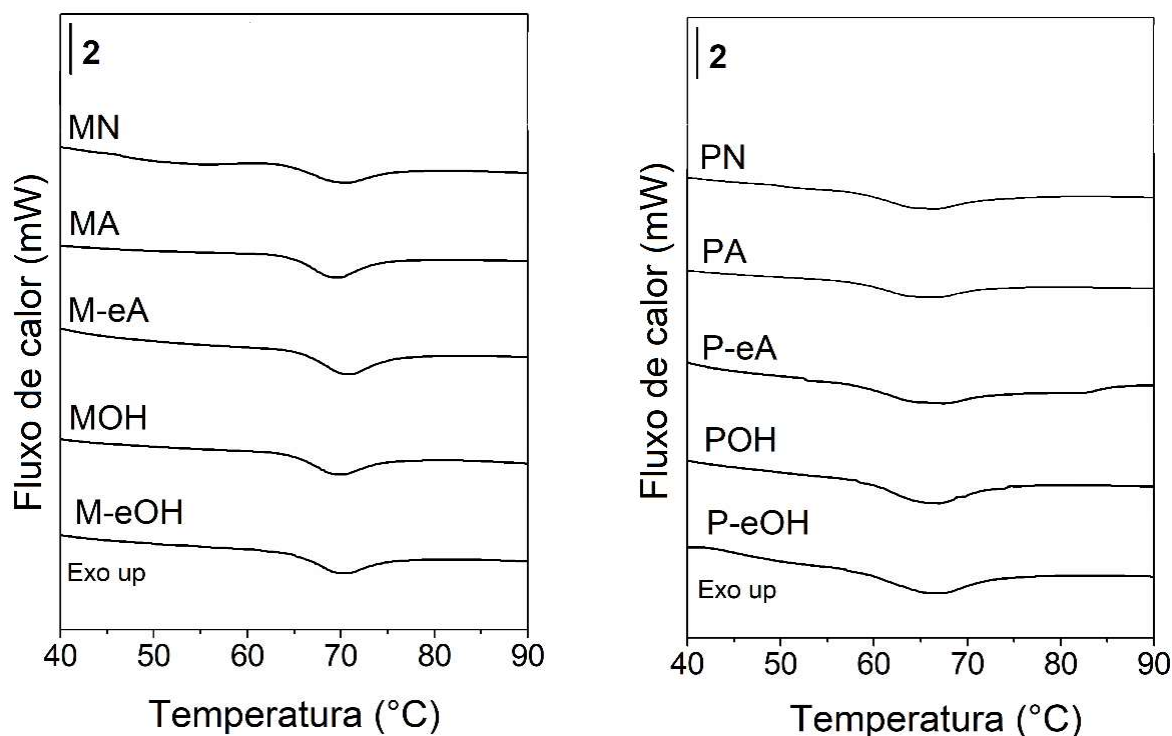
5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Independentemente da fonte botânica, foram observadas pequenas alterações nas temperaturas de gelatinização das amostras (controle e incorporadas com extratos) em relação aos amidos nativos (Figura 5.4).

As faixas de temperatura de gelatinização (R) diminuíram para os amidos de milho após incorporação com extrato (Tabela 5.2), enquanto os amidos de pinhão apresentaram valores mais altos, principalmente quando tratados com extrato etanólico (P-eOH) das cascas de pinhão.

Um aumento no intervalo de gelatinização (R) foi relatado para amidos de arroz e milho adicionados com polifenóis do chá verde em várias proporções (XIAO *et al.*, 2013). Isto pode estar relacionado com a cristalinidade dos amidos que se tornou heterogênea devido à interação entre os grupos OH dos extratos e a região amorfa dos grânulos de amido (WU *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2013).

Figura 5.4 - Curvas de gelatinização DSC dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão



Legenda: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eAq), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (PA), extrato aquoso (P-eA), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

A entalpia de gelatinização calculadas para os amidos nativos de milho e pinhão foram 8,43 e 7,28 J g⁻¹, respectivamente. Os tratamentos apenas com solvente (etanol:água 55:45 v/v ou água destilada) não alteraram o ΔH_{gel} em relação aos amidos nativos. No entanto, após incorporação com extratos das cascas de pinhão, a entalpia de gelatinização dos dois amidos diminuiu. A exceção foi o amido de pinhão incorporado ao extrato etanólico (P-eOH), que não apresentou diferença significativa no ΔH_{gel} em relação ao amido nativo.

De acordo com WU *et al.*(2009), XIAO *et al.*(2013) e ZHU *et al.* (2009), a interação de grupos OH hidrofílicos de compostos fenólicos com amilopectina presentes no amido pode facilitar a hidratação dos grânulos, reduzindo a energia necessária para a gelatinização. No entanto, o aumento da entalpia pode estar relacionado à redistribuição da água entre os compostos e o amido, bem como aos movimentos da água fortemente prejudicados por outros componentes apresentados nos extratos (ZHANG *et al.*, 2015a).

Os amidos de arroz, milho e batata apresentaram redução no ΔH_{gel} à medida que a concentração de polifenóis no chá verde aumentou (XIAO *et al.*, 2013). Por outro lado, não foram observadas grandes diferenças na entalpia para amidos de arroz com diferentes teores de

amiloze na presença de rutina em vários níveis, provavelmente devido à natureza insolúvel da rutina (ZHU; WANG, 2012). Soluções aquosas de catequinas também não promoveram diferenças em ΔH_{gel} para amido de arroz (WU *et al.*, 2015).

Tabela 5.2 - Resultados DSC e cristalinidade relativa dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão

	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	R (°C)	ΔH_{gel} (J g ⁻¹)	CR (%)
MN	64,2±0,3 ^d	69,4 ±0,5 ^{ab}	76,1 ±0,1 ^a	11,8±0,3 ^{de}	8,4 ±0,3 ^a	25,7±0,4 ^a
MA	64,9±0,1 ^c	68,9 ±0,7 ^b	75,3 ±0,1 ^b	10,4±0,1 ^g	8,2 ±0,1 ^{ab}	23,8±0,2 ^{bc}
M-eA	66,3±0,2 ^a	70,3 ±0,1 ^a	75,7 ±0,1 ^{ab}	9,4±0,3 ^g	6,1 ±0,1 ^f	22,6±0,4 ^{cd}
MOH	65,3±0,2 ^{bc}	69,4 ±0,3 ^{ab}	75,8 ±0,1 ^{ab}	10,5±0,3 ^{fg}	8,1 ±0,2 ^{ab}	25,0±0,2 ^{ab}
M-eOH	65,6±0,2 ^b	69,7 ±0,2 ^{ab}	74,6 ±0,3 ^c	9,1±0,1 ^h	6,5 ±0,3 ^{ef}	22,1±0,5 ^d
PN	58,9±0,3 ^f	64,6 ±0,1 ^c	71,1 ±0,2 ^f	12,2±0,4 ^{cd}	7,3 ±0,1 ^{cd}	24,8±0,4 ^{ab}
PA	58,8±0,3 ^f	64,7 ±0,7 ^{de}	71,9 ±0,1 ^c	13,0±0,4 ^b	7,1 ±0,3 ^{de}	22,7±0,2 ^d
P-eA	59,4±0,2 ^f	64,6 ±0,3 ^c	70,6 ±0,1 ^f	11,3±0,3 ^{ef}	4,5 ±0,2 ^g	23,8±0,5 ^{bc}
POH	60,3±0,1 ^c	66,8 ±0,2 ^c	73,0 ±0,1 ^d	12,7±0,2 ^{bc}	7,0 ±0,1 ^{de}	25,9±1,1 ^a
P-eOH	58,2±0,1 ^g	65,8±0,2 ^{cd}	74,2±0,3 ^c	16,0±0,1 ^a	7,7±0,1 ^{bc}	22,6±0,3 ^{cd}
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.

^{a, b, c} Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

To – temperatura "onset" ou inicial; Tp - temperatura de pico; Tc - temperatura de conclusão ou final; R = Tc-To - intervalo de gelatinização; ΔH_{gel} - entalpia de gelatinização; CR – cristalinidade relativa.

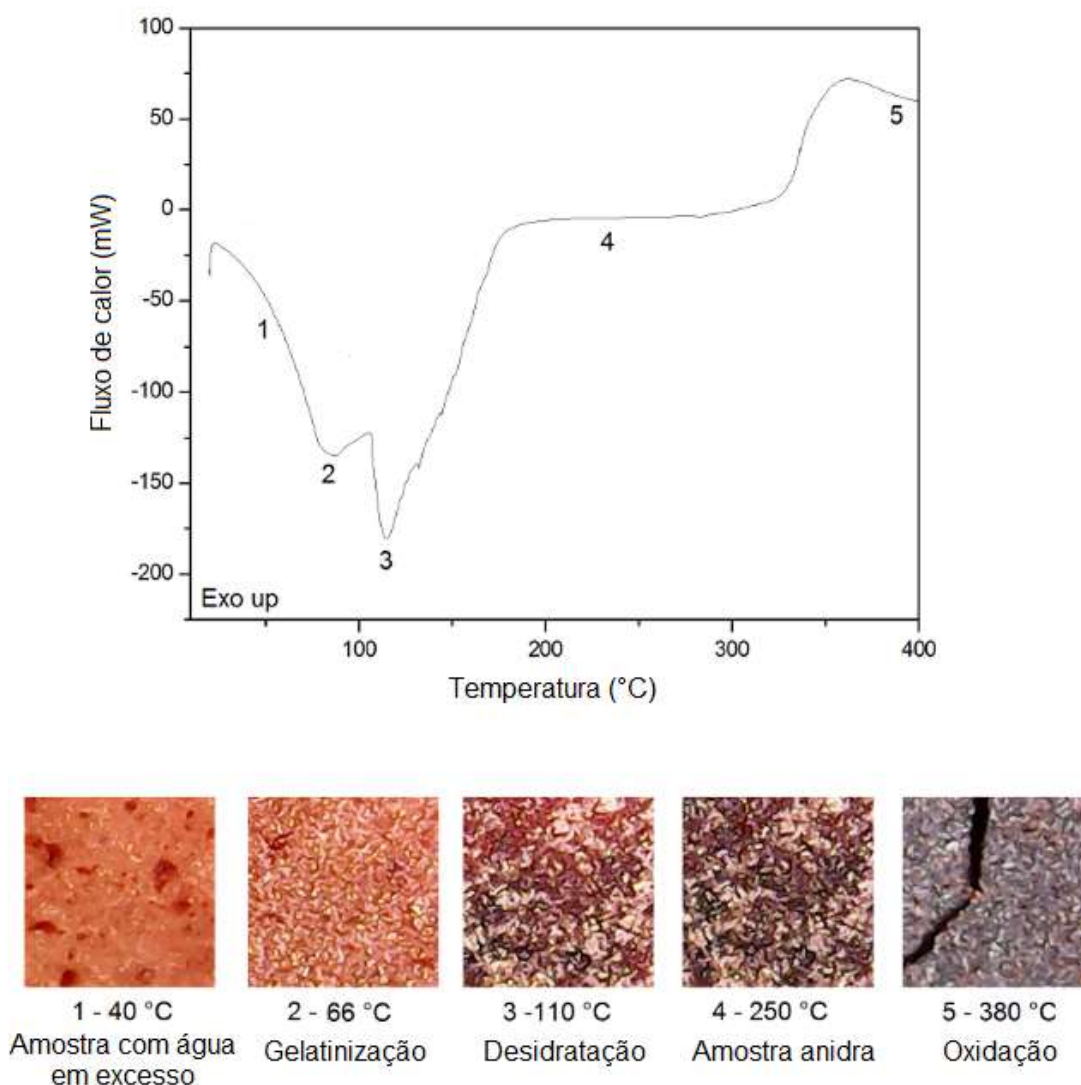
Legenda: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eAq), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (PA), extrato aquoso (P-eA), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

Diferentes resultados nas temperaturas e entalpia de gelatinização são obtidos de acordo com a composição, quantidade, concentração, solubilidade e tipo de composto fenólico dos extratos. O tipo e estrutura do amido e as condições da análise DSC também influenciam as propriedades térmicas do amido (WU *et al.*, 2015; ZHU; WANG, 2012).

A Figura 5.5 mostra a curva DSC e a termomicroscopia da amostra P-eOH, representativa de todas as amostras. Abaixo de 50 °C é possível observar a amostra com água em excesso, o brilho da imagem é devido à reflexão da luz. Após a gelatinização (66 °C), é observada uma diminuição no brilho da amostra, uma vez que a gelatinização faz com que o excesso de água seja adsorvido pelos grânulos de amido. Entre 95 °C e 120 °C ocorre a desidratação, as imagens mostram a retração da amostra e um aparente aumento da rugosidade. A partir desta temperatura não há alteração até próximo a 350 °C quando é possível observar o início da carbonização da amostra.

A curva DSC mostra três eventos térmicos, o primeiro com o evento endotérmico atribuído à gelatinização com pico a 66 °C, seguido de desidratação com um pico endotérmico a 110 °C, após a desidratação a amostra anidra é termicamente estável a cerca de 350 °C quando a oxidação e a decomposição começam com um evento exotérmico associado. Esse comportamento foi observado para todas as amostras.

Figura 5.5 - Curva DSC e imagens termomicroscópicas de 10-400 °C da amostra P-eOH, representativas das demais amostras.



5.3.3 Difratometria de raios X pelo método do pó (DRX)

Os difratogramas de raios X estão apresentados na Figura 5.6. De acordo com Daudt *et al.* (2015), o padrão de difração do tipo-A foi observado para o amido de milho nativo, pois apresenta picos em 15 e 23° e um dublete em 17 e 18° (20).

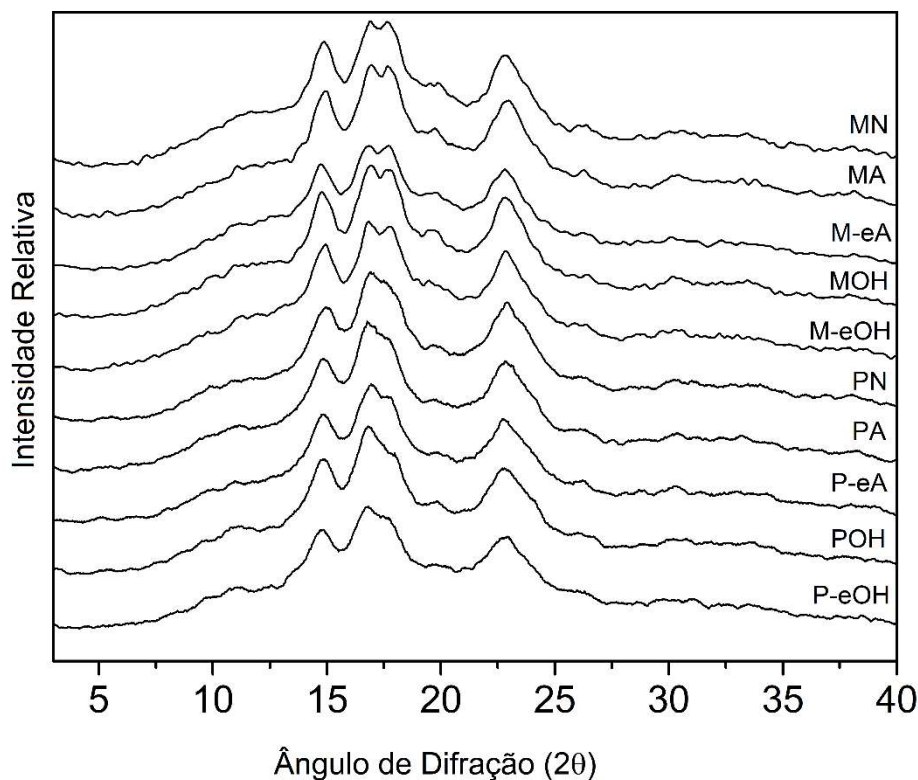
O amido de pinhão nativo apresenta picos de 15° , 17° e 23° (2 θ). Esses picos estão relacionados ao tipo-C, uma mistura de padrões do tipo A e B. Comportamento semelhante foi relatado por Daudt *et al.* (2015) e Costa *et al.* (2013), no entanto, Conforti e Lupano (2007) caracterizam o amido de pinhão como tipo-A, apesar de apresentarem os mesmos picos.

Os padrões de difração não foram alterados pelos tratamentos, desta forma, nenhuma amostra perdeu sua estrutura semicristalina após tratamentos com apenas solventes ou com extratos de casca de pinhão.

A cristalinidade relativa (CR) dos amidos variou entre 22,1 e 25,9 % (Tabela 5.2). O contato com etanol:água 55:45 v/v não alterou a CR de ambos os amidos, enquanto o tratamento com água deionizada diminuiu esse valor.

As amostras incorporadas com extratos etanólicos apresentaram menor CR do que o respectivo amido não tratado. Chai; Wang e Zhang (2013) relataram que os polifenóis do chá interferiram no processo normal de automontagem da amilose para formar uma estrutura ordenada de duplas hélices e domínios cristalinos.

Figura 5.6- Difrátogramas de raios X dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão



Legenda: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eAq), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (PA), extrato aquoso (P-eA), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As principais bandas observadas para a amostra de amido podem ser observadas na Tabela 5.3. As bandas observadas na região entre 3200-3400 cm^{-1} são atribuídas à água de hidratação presente no amido, corroborando com os dados observados nas curvas TG. A região entre 2931 e 2800 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-H, a banda de intensidade média próxima a 1640-1660 cm^{-1} está associada ao estiramento das moléculas de H_2O da região não cristalina do amido (CAEL; KOENIG; BLACKWELL, 1975; KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002).

Tabela 5.3 – Principais bandas observadas no FTIR dos amidos de milho e pinhão nativos, tratados com solventes e incorporados com extratos da casca de pinhão

Modos de vibração	MN	MA	M-eA	MOH	M-eOH	PN	PA	P-eA	POH	P-eOH
Deformação axial O–H (H-ligado)	3393	3392	3410	3392	3412	3414	3402	3412	3407	3398
Deformação axial CH, CH ₂	2929 2881	2929 2895	2927 2891	2931 2893	2931 2889	2929 2981	2931 2891	2927 2885	2926 2893	2926 2893
H ₂ O (região não cristalina)	1656	1656	1648	1647	1639	1645	1647	1643	1652	1657
Deformação angular C–O–H, Torção CH ₂	1340	1338	1339	1338	1338	1339	1338	1342	1340	1340
CH ₂ OH	1241	1240	1240	1240	1244	1242	1244	1242	1244	1244
Estiramento assimétrico da ligação glicosídica C–O–C	1158	1159	1157	1157	1157	1157	1161	1159	1163	1161
Deformação axial C–O, C–C e O–H	1078	1080	1080	1082	1080	1079	1082	1082	1082	1082
Deformação axial C–O, C–C, deformação angular C–O–H	1016	1020	1018	1015	1018	1019	1016	1018	1012	1014
Deformação angular C–O–H	994	995	995	993	993	994	991	991	991	991
Vibração de esqueleto das ligações α - glicosídicas C–O–C	928	931	931	929	929	928	931	929	927	927

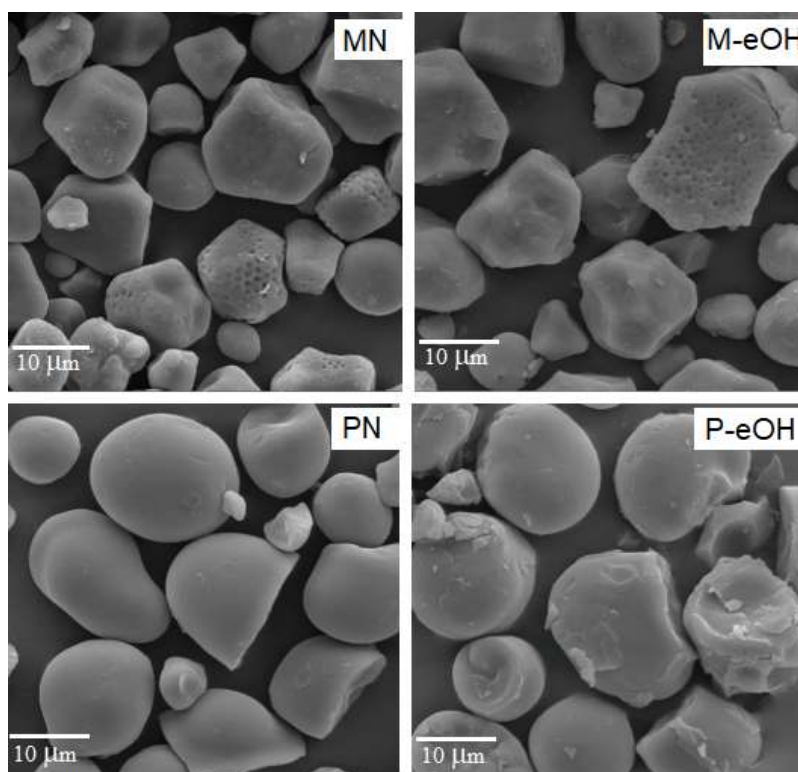
Legenda: amido de milho nativo (MN) e tratado com: água deionizada (MA), extrato aquoso (M-eAq), etanol 55 % (MOH) e extrato etanólico (M-eOH); amido de pinhão nativo (PN) e tratado com: água deionizada (PA), extrato aquoso (P-eA), etanol 55 % (POH) e extrato etanólico (P-eOH).

Estudos mostram uma relação entre as bandas 1022 e 1047 cm^{-1} com as regiões não-cristalinas e cristalinas do amido, respectivamente (CAPRON *et al.*, 2007; CHAI; WANG; ZHANG, 2013). Neste estudo, essas bandas foram deslocadas para regiões próximas a 1015 e 1080 cm^{-1} , respectivamente. Essa variação pode ser explicada por alterações nas proporções de amilose e amilopectina das amostras, e um estudo da intensidade dessas bandas pode permitir uma boa correlação com os resultados obtidos por DRX.

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Através das imagens obtidas pelo FEG, foi possível avaliar as alterações morfológicas nos grânulos de amido nativo e modificado. De acordo com a Figura 5.7, o amido de pinhão nativo apresentou uma mistura de grânulos de forma arredondada com superfície lisa, ausência de poros e tamanho variando de 10 a 25 μm , conforme relatado por outros autores (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2011; DAUDT *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2015a).

Figura 5.7 - Microimagens dos amidos nativos de milho (MN) e pinhão (PM) e após incorporação com extratos etanólicos de cascas de pinhão (M-eOH e P-eOH)



O amido de milho nativo apresentou forma poligonal com bordas bem definidas, com superfície porosa e tamanho menor ($<7\mu\text{m}$). Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang; Ao e Hamaker (2006).

Os tratamentos com apenas solventes (água deionizada ou etanol:água 55:45 v/v) e com extrato aquoso de cascas de pinhão não alteraram a morfologia dos grânulos em relação ao amido nativo (imagens não mostradas).

Após incorporação com extrato etanólico das cascas de pinhão, as características morfológicas dos grânulos de amido de milho não sofreram alterações. No entanto, os grânulos de amido de pinhão mostraram uma aparência ligeiramente degradada por descascamento das camadas superficiais. Nenhuma erosão aparente (poros) foi detectada.

Santos *et al.* (2018) observaram alterações nas cascas de pinhão após extração etanólica de compostos antioxidantes. As cascas foram mais desfibriladas quando temperaturas mais altas e concentrações mais baixas da solução etanólica foram aplicadas. Esse processo levou a um menor rendimento volumétrico, uma vez que as matrizes desfibriladas retêm mais extrato.

5.4 CONCLUSÃO

Quando os extratos aquoso e etanólico das cascas de pinhão foram incorporados aos amidos, observou-se uma diminuição no seu platô de estabilidade térmica, enquanto nas amostras controle (tratadas apenas com água e etanol:água 55:45 v/v) nenhuma diferença foi observada. As temperaturas finais após a oxidação, para os dois amidos, também apresentaram o mesmo comportamento, menor nas amostras com compostos fenólicos e maior nas amostras controle, em relação às nativas.

Não foram observadas diferenças significativas na entalpia de gelatinização entre a amostra controle e as amostras nativas. Após os tratamentos, a energia necessária para a gelatinização aumentou apenas para o amido de pinhão incorporado ao extrato etanólico. Pequenas mudanças foram observadas nas temperaturas de gelatinização das amostras em relação aos amidos nativos, independentemente da fonte botânica.

É possível observar uma tendência de aumento proporcional entre os valores de cristalinidade relativa e entalpia de gelatinização, bem como uma boa correlação desses dados com os observados pelo FTIR.

Morfológicamente, os grânulos de amido de milho foram pouco afetados pelos tratamentos e os grânulos de amido de pinhão apresentaram descamação da superfície após a incorporação de extratos etanólicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O amido de pinhão é facilmente extraído da polpa por processo aquoso e apresenta rendimento aproximado de 34 %. A extração pode ser considerada um processo verde, que colabora com as questões ambientais por não usar reagentes.

Para aumentar o rendimento do processo é possível aplicar outras técnicas ambientalmente corretas para remover o material amiláceo preso nas fibras do bagaço residual, tais como repetidas extrações e lavagens ou uso ultrassom. No entanto, a presença de amido no bagaço pode favorecer a sua aplicação onde características de textura e viscosidade são desejadas.

Como o bagaço apresentou composição proximal de interesse para o desenvolvimento de produtos alimentícios, a fim de direcionar uma aplicação e valorizar este coproduto, paralelamente foi conduzido um trabalho de formulação e avaliação de biscoitos com alto teor de fibras. Os resultados estão sendo discutidos para posterior submissão de um artigo científico.

O amido de pinhão nativo apresenta propriedades térmicas e de pasta que o tornam atrativo para aplicação em diversos tipos de produtos alimentícios. A temperatura de pasta e de gelatinização do amido de pinhão nativo possibilitam seu emprego quando se necessita de um aumento de viscosidade a temperatura menor que 70 °C.

Devido a sua maior capacidade de absorção de água, o amido modificado com tripolifosfato de sódio apresentou maior viscosidade de pico e formou pasta em temperatura menor que 50°C. A viscosidade final do amido fosfatado é maior que a do amido nativo. Assim, o amido de pinhão fosfatado pode ser aplicado em produtos que necessitem de maior retenção de água, ajudando a reduzir a sinérese. Amidos fosfatados também podem ser empregados como agentes emulsificantes na indústria de alimentos.

Como continuidade deste capítulo, foi realizada a aplicação de amido de pinhão fosfatado em iogurte natural com resultados positivos na sinérese e textura do produto.

Este trabalho apresentou pela primeira vez o tratamento com moinho de bolas em amidos fosfatados. Além disso, a análise de espectroscopia por dispersão de raios X por comprimento de onda foi utilizada para avaliação do teor de sódio em amido fosfatado com tripolifosfato de sódio, no qual até então eram observados apenas o teor de fósforo. Estes resultados foram submetidos à uma revista científica e está em fase de revisão.

O amido fosfatado e moído apresentou os menores valores de temperatura e entalpia de gelatinização, favoráveis ao seu emprego industrial por demandar de menor energia para formação de pasta. Além disso, por ter sua área superficial aumentada devido aos danos causados na sua superfície, é possível que o amido fosfatado submetido ao tratamento com moinho de bolas apresente características que auxiliem ainda mais na retenção de umidade.

Amidos moídos são mais solúveis, assim podem ser empregados para incorporar algum componente à sua estrutura, sendo facilmente absorvidos pelo corpo humano.

A obtenção de extratos a partir da casca de pinhão mostrou-se uma alternativa viável para valorizar este coproduto da extração de amido. Embora demais autores tenham verificado a presença de compostos fenólicos em extratos das cascas de pinhão obtidos em meio aquoso e etanólico, é necessário realizar pesquisas de identificação e quantificação destes compostos nos extratos obtidos no presente estudo. Além disso, sugere-se a avaliação do potencial antioxidante dos extratos e do amido após a realização do tratamento.

Os amidos incorporados com os extratos da casca de pinhão podem ser úteis para desenvolvimento de embalagens ou alimentos com potencial antioxidante. Também podem ser empregados como fonte de compostos fenólicos para indústrias cosméticas, por exemplo. Como continuidade deste capítulo, os géis resultantes da análise de RVA foram avaliados e os resultados trouxeram importantes informações de forma a ampliar ainda mais a gama de aplicação deste amido. Estes dados serão utilizados para redação de artigo científico.

De uma forma geral, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que o amido de pinhão nativo e modificado apresentou aspectos que o tornam um meio viável e eficiente para desenvolvimento de produtos para as indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética.

Contudo, proporcionar condições favoráveis ao uso de todas as frações do pinhão, pode colaborar com a conservação da espécie e gerar valor agregado ao produto, favorecendo especialmente aqueles que se utilizam de sua coleta e comercialização para complementar a renda de sua família.

REFERÊNCIAS

- ACORSI, D. M. *et al.* Viabilidade do processamento de biscoitos com farinha de pinhão. Viability of cookie-processing with Paraná pine nut flour. **Agris**, v. 5, n. 2, p. 207–212, 2009.
- AHMADU, U. *et al.* Physicochemical and material properties of starches from three cultivars of *Dioscorea rotundata*. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p. 79–83, 2018.
- AI, Y.; JANE, J. L. Gelatinization and rheological properties of starch. **Starch/Stärke**, v. 67, n. 3–4, p. 213–224, 2015.
- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; MEIRELES, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 215–236, 2015.
- AMARANTE, C. V. T. DO *et al.* Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 346–351, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 17. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemistry, 2000.
- ASCHERI, D. P. R.; PEREIRA, L. D.; BASTOS, S. M. C. Chemical, morphological, rheological and thermal properties of *Solanum lycocarpum* phosphorylated starches. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 458–466, 2014.
- BARBOSA, J. Z. *et al.* Elemental composition and nutritional value of *Araucaria angustifolia* seeds from subtropical Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 1073–1077, 2019.
- BATISTA, W. P.; SILVA, C. E. M. DA; LIBERATO, M. C. Propriedades químicas e de pasta dos amidos de trigo e milho fosforilados. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 88–93, 2010.
- BEHLING, E. B. *et al.* Flavónoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.
- BELLO-PÉREZ, L. A. *et al.* Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A novel starch for application in food industry. **Starch/Stärke**, v. 58, n. 6, p. 283–291, 2006.
- BEMILLER, J. N. Starch Modification: Challenges and Prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 4, p. 127–131, 1997.
- BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Physical Modification of Food Starch Functionalities. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 19–69, 2015.
- BENINCA, C. *et al.* Thermal behavior of corn starch granules modified by acid treatment at 30

and 50°C. **Ecletica Quimica**, v. 33, n. 3, 2008.

BENINCA, C. *et al.* Thermal, rheological, and structural behaviors of natural and modified cassava starch granules, with sodium hypochlorite solutions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2217–2222, 2013a.

BENINCA, C. *et al.* The thermal, rheological and structural properties of cassava starch granules modified with hydrochloric acid at different temperatures. **Thermochimica Acta**, v. 552, p. 65–69, 2013b.

BENINCA, C. *et al.* Corn and pinhão starches modified with sodium tripolyphosphate: thermal, pasting, structural and morphological properties. **Starch/Stärke**, v. 1800290, p. 1–8, 2019.

BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. DE. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 739–746, 2016.

BERTOFT, E. Plant starch synthesis. In: ELIASSON, A.-C. (Ed.). **Starch in food: Structure, function and applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004. p. 597.

BET, C. D. *et al.* Common vetch (*Vicia sativa*) as a new starch source: its thermal, rheological and structural properties after acid hydrolysis. **Food Biophysics**, v. 11, n. 3, p. 275–282, 2016.

BET, C. D. *et al.* Influence of the addition of hydrocolloids on the thermal, pasting and structural properties of starch from common vetch seeds (*Vicia sativa* sp). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 549–557, 2018a.

BET, C. D. *et al.* Organic amaranth starch: A study of its technological properties after heat-moisture treatment. **Food Chemistry**, v. 264, p. 435–442, 2018b.

BET, C. D. *et al.* Aqueous extraction of organic amaranth starch and their by-products. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1–17, 2019.

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). **Ecletica Quimica**, v. 34, n. 1, p. 7–12, 2009.

BISINELLA, R. Z. B. *et al.* Some instrumental methods applied in food chemistry to characterise lactulose and lactobionic acid. **Food Chemistry**, v. 220, p. 295–298, 2017.

BLASZCZAK, W. *et al.* Effect of phosphorylation and pretreatment with high hydrostatic pressure on radical processes in maize starches with different amylose contents. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 86–96, 2011.

BLENNOW, A. *et al.* Starch phosphorylation: a new front line in starch research. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 10, p. 445–450, 2002.

BOLZAN, A. B. *et al.* Elaboração e caracterização de doce cremoso de caqui com adição de sementes da araucária. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 1–11, 2017.

BRANCO, C. S.; RODRIGUES, T. S. Chemical constituents and biological activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **Journal of Organic & Inorganic**

Chemistry, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2016.

BRASIL. **Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864>

BRASIL, J. L. *et al.* Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 133, n. 1–3, p. 143–153, 2006.

CAEL, J. J.; KOENIG, J. L.; BLACKWELL, J. Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part VI: Normal coordinate analysis of V-amylose. **Biopolymers**, 1975.

CAI, J. *et al.* Structural and functional properties of C-type starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 289–300, 2014.

CAPELLA, A. C. DE C.; PENTEADO, P. T. P. D. S.; BALBI, M. E. Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. **Boletim do CEPPA**, v. 27, n. 1, p. 135–142, 2009.

CAPRON, I. *et al.* Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 249–259, 2007.

CARBINATTO, F. M. *et al.* Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012.

CARLSTEDT, J. *et al.* Understanding starch gelatinization: The phase diagram approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 62–69, 2015.

CAVALLINI, C. M.; FRANCO, C. M. L. Effect of acid-ethanol treatment followed by ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava starch. **Starch/Stärke**, v. 62, p. 236–245, 2010.

CHAI, Y.; WANG, M.; ZHANG, G. Interaction between amylose and tea polyphenols modulates the postprandial glycemic response to high-amylose maize starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 36, p. 8608–8615, 2013.

CLADERA-OLIVERA, F. **Estudos tecnológicos e de engenharia para o armazenamento e processamento do pinhão**. [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F. *et al.* Modeling water adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia*) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 3, p. 826–843, 2011.

COLMAN, T. A. D.; DEMIATE, I. M.; SCHNITZLER, E. The effect of microwave radiation on some thermal, rheological and structural properties of cassava starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2245–2252, 2014.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Starch characterisation of *Araucaria angustifolia* and

Araucaria araucana seeds. **Starch/Stärke**, v. 59, n. 6, p. 284–289, 2007.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Comparative study of the starch digestibility of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seed flour. **Starch/Stärke**, v. 60, n. 3–4, p. 192–198, 2008.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Selected properties of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seed protein. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 1, p. 84–91, 2011.

COPELAND, L. *et al.* Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.

CORDENUNSI, B. R. *et al.* Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3412–3416, 2004.

CORDOBA, L. DO P. *et al.* Effect of enzymatic treatments on thermal, rheological and structural properties of pinhão starch. **Thermochimica Acta**, v. 642, p. 45–51, 2016.

CORDOBA, L. DO P.; BET, C. D.; SCHNITZLER, E. Study by thermal methods of pinhão starch modified with lactic acid. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 7, n. 4, p. 41–47, 2015.

CORNEJO, F. E. P. *et al.* Descascamento e Secagem de Pinhão (*Araucaria angustifolia*) para a Obtenção de Farinha. **Embrapa**, p. 3 p, 2014.

CORREIA, P. R.; BEIRÃO-DA-COSTA, M. L. Chestnut and acorn starch properties affected by isolation methods. **Starch - Stärke**, v. 62, p. 421–428, 2010.

COSTA, F. J. DA O. G. *et al.* Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 172–177, 2013.

DAI, L. *et al.* Preparation and characterization of starch nanocrystals combining ball milling with acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 122–127, 2018.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: [s.n.].

DANNER, M. A.; ZANETTE, F.; RIBEIRO, J. Z. O cultivo da araucária para produção de pinhões como ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 441–451, 2012.

DAUDT, R. M. *et al.* Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, 2014.

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

DAUDT, R. M. *et al.* Comparative study on properties of edible films based on pinhão (*Araucaria angustifolia*) starch and flour. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 279–287, 2016.

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.

DELVAL, F. *et al.* Characterization of crosslinked starch materials with spectroscopic techniques. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 6, p. 2650–2663, 2004.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. DA. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DUPUIS, J. H. *et al.* Physicochemical properties and in vitro digestibility of potato starch after inclusion with vanillic acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 218–224, 2017.

EL-NAGGAR, M. E. *et al.* Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 718–729, 2015.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Compendium of Food Additive Specifications**. 74th Meeting. Rome: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2011.

FAO, F. AND AGRICULTURAL O. H. OF THE U. N. W. H. ORGANIZATION. Food labelling complete texts revised in 2001. . 2001.

FARIAS, F. O. *et al.* Characterisation of cassava bagasse and composites prepared by blending with low-density polyethylene. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 821–830, 2014.

FERREIRA, D. K. **Caracterização genética e estrutura populacional de diferentes origens de *Araucaria angustifolia* na Flona de Três Barras**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

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

FU, Z. Q. *et al.* Retrogradation of partially gelatinised potato starch prepared by ball milling. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1065–1071, 2018.

FU, Z. QIANG *et al.* Effect of acid-alcohol treatment on physicochemical properties of ball-milled potato starches. **Starch/Stärke**, v. 71, n. 5–6, p. 1–7, 2019.

GAO, F. *et al.* Preparation and characterization of starch crosslinked with sodium trimetaphosphate and hydrolyzed by enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 310–318, 2014.

GODOY, R. C. B. DE *et al.* **O pinhão na culinária**. 1a. ed. Brasília: [s.n.].

GODOY, R. C. B. DE *et al.* Consumidor de pinhão: hábitos, atributos de importância e percepção. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 38, 2018.

GONÇALVES, A. R. *et al.* **Plano de Manejo da Floresta Nacional de Três Barras - Diagnóstico**. v. 1 ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade,

2016.

GONÇALVES, P. M. *et al.* Characterization of starch nanoparticles obtained from *Araucaria angustifolia* seeds by acid hydrolysis and ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 21–27, 2014.

GRANZA, A. G. *et al.* Effects of acetylation and acetylation-hydroxypropylation (dual-modification) on the properties of starch from Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, p. 769–777, 2015.

GUTIÉRREZ, T. J.; ALVAREZ, V. A. Bionanocomposite films developed from corn starch and natural and modified nano-clays with or without added blueberry extract. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 407–420, 2018.

GUZAR, I.; RAGAE, S.; SEETHARAMAN, K. Mechanism of hydrolysis of native and cooked starches from different botanical sources in the presence of tea extracts. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, p. 1192–1196, 2012.

HE, S. *et al.* Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. **Biotechnology Reports**, v. 3, p. 54–59, 2014.

HENRÍQUEZ, C. *et al.* Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 592–601, 2008.

HEO, H. *et al.* Rheological, pasting, and structural properties of potato starch by cross-linking. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. 2138–2151, 2017.

HONG, J. S.; GOMAND, S. V.; DELCOUR, J. A. Preparation of cross-linked maize (*Zea mays* L.) starch in different reaction media. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 302–310, 2015.

HORNUNG, P. S. *et al.* Novel Oxidized and UV-Irradiated *Araucaria angustifolia* Pine Seed Starch for Enhanced Functional Properties. **Starch/Stärke**, v. 71, n. 3–4, p. 1–10, 2019.

HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Location of sites of reaction within starch granules. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 173–180, 2001.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/16/12705>>. Acesso em: 23 set. 2019.

IONASHIRO, M.; CAIRES, F. J.; GOMES, D. J. C. **Giolito - Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial / Calorimetria Exploratória Diferencial**. 2. ed. São Paulo: Giz Editorial, 2014.

ISMAILOGLU, S. O.; BASMAN, A. Effects of infrared heat-moisture treatment on physicochemical properties of corn starch. **Starch/Stärke**, v. 67, p. 528–539, 2015.

IURCKEVICZ, G.; MARQUES, P. T.; LIMA, V. A. DE. Chemical and chemometric analysis of modified starch matrices for sodium trimetaphosphate. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1462–1480, 2017.

JAMBRAK, A. R. *et al.* Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 91–100, 2010.

JORGE, T. *et al.* Physicochemical study of pinhão flour as source of adjunct in beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 365–373, 2018.

JUANSANG, J. *et al.* Effect of gelatinisation on slowly digestible starch and resistant starch of heat-moisture treated and chemically modified canna starches. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 500–507, 2012.

KAHRAMAN, K.; KOKSEL, H.; NG, P. K. W. Optimisation of the reaction conditions for the production of cross-linked starch with high resistant starch content. **Food Chemistry**, v. 174, p. 173–179, 2015.

KAUR, L.; SINGH, J.; SINGH, N. Effect of cross-linking on some properties of potato (*Solanum tuberosum* L.) starches. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1945–1954, 2006.

KIM, S. K.; KIM, H. Y. Pasting properties of colored rice starch by ball-mill treatment. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 161–166, 2014.

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and glycemic control. **Nutrients**, v. 8, n. 17, p. 1–27, 2016.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3912–3918, 2002.

KLEIN, B. *et al.* Effect of single and dual heat-moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1578–1584, 2013.

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.

KOO, S. H.; LEE, K. Y.; LEE, H. G. Effect of cross-linking on the physicochemical and physiological properties of corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6–7, p. 619–625, 2010.

LACERDA, L. G. *et al.* The effects of heat-moisture treatment on avocado starch granules. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 387–393, 2015.

LEITE, D. M. *et al.* Nutritional evaluation of *Araucaria angustifolia* seed flour as a protein complement for growing rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1166–1171, 2008.

LELIÈVRE, J.; LIU, H. A review of thermal analysis studies of starch gelatinization. **Thermochimica Acta**, v. 246, p. 309–315, 1994.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 579–588, 2007.

LI, B. ZHENG *et al.* Physical properties and loading capacity of starch-based microparticles crosslinked with trisodium trimetaphosphate. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 3, p. 255–260, 2009.

LIM, S.; SEIB, P. A. Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 137–144, 1993.

LIMA, E. C. *et al.* Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, p. 211–220, 2007.

LIU, H.; RAMSDEN, L.; CORKE, H. Physical properties and enzymatic digestibility of phosphorylated ae, wx, and normal maize starch prepared at different pH levels. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 938–943, 1999.

LIU, J. *et al.* Functional, physicochemical properties and structure of cross-linked oxidized maize starch. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 45–52, 2014.

LIU, T. Y. *et al.* The effect of ball milling treatment on structure and porosity of maize starch granule. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 586–593, 2011.

LIU, Y. *et al.* Thermal behavior of sweet potato starch by non-isothermal thermogravimetric analysis. **Materials**, v. 12, n. 5, p. 699, 2019.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. DE L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2003.

LOZANO-NAVARRO, J. I. *et al.* Chitosan-starch films with natural extracts: Physical, chemical, morphological and thermal properties. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2018.

LUCHESI, C. L. *et al.* Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 203–210, 2015.

LV, Y. *et al.* Physicochemical properties and digestibility of potato starch treated by ball milling with tea polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 207–213, 2019.

MASON, T. J.; PANIWNKY, L. The uses of ultrasound in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 253–260, 1996.

MORAES, J.; ALVES, F. S.; FRANCO, C. M. L. Effect of ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava and Peruvian carrot starches. **Starch/Stärke**, v. 65, n. 3–4, p. 200–209, 2013.

MOTA, G. S. T. DA *et al.* Antioxidant activity of cosmetic formulations based on novel extracts from seeds of Brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertoll) Kuntze. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, p. 190–202, 2014.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch - Stärke**, v. 35, n. 12, p. 407–410, 1983.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO**. 4a. ed. Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011.

NEWPORT SCIENTIFIC. **Interpreting Test Results Rapid Visco Analyser: Instalation and**

Operation Manual. Kungens Kurva: [s.n.].

NODA, T. *et al.* Determination of the phosphorus content in potato starch using an energy-dispersive X-ray fluorescence method. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 632–637, 2006.

OLIVEIRA, C. S. DE *et al.* Heat-moisture treatment (HMT) on blends from potato starch (PS) and sweet potato starch (SPS). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 3, p. 1491–1498, 2018a.

OLIVEIRA, C. S. DE *et al.* Effect of ball milling on thermal, morphological and structural properties of starches from *Zingiber officinale* and *Dioscorea* sp. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 90–103, 2018b.

PAREDES-LÓPEZ, O.; BELLO-PÉREZ, L. A.; LÓPEZ, M. G. Amylopectin : Structural , gelatinisation and retrogradation studies. **Food Chemistry**, v. 50, p. 411–417, 1994.

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.

PINTO, V. Z. *et al.* Physicochemical, crystallinity, pasting and thermal properties of heat-moisture-treated pinhão starch. **Starch/Stärke**, v. 64, n. 11, p. 855–863, 2012.

PINTO, V. Z. *et al.* Molecular structure and granule morphology of native and heat-moisture-treated pinhão starch. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 282–289, 2015a.

PINTO, V. Z. *et al.* Effects of single and dual physical modifications on pinhão starch. **Food Chemistry**, v. 187, p. 98–105, 2015b.

POLET, J. P. *et al.* Physico-chemical and sensory characteristics of gluten-free breads made with pine nuts (*Araucaria angustifolia*) associated to other flours. **Journal of Culinary Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 136–145, 2019.

POLNAYA, F. J. *et al.* Effects of phosphorylation and cross-linking on the pasting properties and molecular structure of sago starch. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, p. 1609–1615, 2013.

POLNAYA, F. J.; MARSENO, D. W.; CAHYANTO, M. N. Physical properties and digestibility of resistant starch from phosphorylated sago starches. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 199–206, 2018.

PRATIWI, M.; FARIDAH, D. N.; LIOE, H. N. Structural changes to starch after acid hydrolysis, debranching, autoclaving-cooling cycles, and heat moisture treatment (HMT): A review. **Starch/Stärke**, v. 1700028, n. 70, p. 1–13, 2018.

PREISS, J. Plant starch synthesis. In: ELIASSON, A.-C. (Ed.). . **Starch in food: Structure, function and applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004. p. 597.

RATNAYAKE, W. S.; OTANI, C.; JACKSON, D. S. DSC enthalpic transitions during starch gelatinisation in excess water, dilute sodium chloride and dilute sucrose solutions. **Journal of**

the Science of Food and Agriculture, v. 89, n. 12, p. 2156–2164, 2009.

REN, C.; SHIN, M. Effects of cross-linked resistant rice starch on the quality of Korean traditional rice cake. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 697–704, 2013.

RIBEIRO, L. S. *et al.* Influence of some sugars on the thermal, rheological and morphological properties of “pinhão” starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 117, n. 2, p. 935–942, 2014.

ROA, D. F. *et al.* Ball milling of amaranth starch-enriched fraction. Changes on particle size, starch crystallinity, and functionality as a function of milling energy. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2723–2731, 2014.

RODRIGUEZ-GARCIA, M. E. *et al.* Effect of the crystal size on the X-ray diffraction patterns of isolated starches. **arXiv:1808.02966**, 2018.

RODRIGUEZ-SANDOVAL, E.; OTÁLVARO-ARENAS, J. A.; HERNANDEZ, V. Bread quality of flours substituted with modified cassava starches. **Starch/Stärke**, v. 69, n. 1600253, p. 1–9, 2017.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant Starch - A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1–17, 2006.

SANGUANPONG, V. *et al.* Preparation and structural properties of small-particle cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 760–768, 2003.

SANT’ANNA, C. S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e dispersão realizada de pólen e sementes em uma população contínua de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no Planalto Norte de Santa Catarina.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

SANT’ANNA, V. *et al.* Effect of cooking on polyphenols and antioxidant activity of *Araucaria angustifolia* seed coat and evaluation of phytochemical and microbiological stability over storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 1932–1936, 2016.

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.

SANTOS, A. J. DOS *et al.* Aspectos produtivos e comerciais do pinhão no Estado do Paraná. **Floresta**, v. 32, n. 2, p. 163–169, 2002.

SANTOS, F. A. DOS; PIRES, M. J. R.; CANTELLI, M. Tratamento de efluente de galvanoplastia por meio da bioissorção de cromo e ferro com escamas da pinha da *Araucaria angustifolia*. **Revista Escola de Minas**, v. 64, n. 4, p. 499–504, 2011.

SANTOS, T. P. R. DOS *et al.* Improvement in spray-drying technology for preparation of pregelatinized cassava starch. **Food Science and Technology**, p. 1–8, 2019.

SECHI, N. DA S. M.; MARQUES, P. T. Preparation and physicochemical, structural and morphological characterization of phosphorylated starch. **Materials Research**, v. 20, p. 174–180, 2017.

SHI, L. *et al.* Physicochemical changes of maize starch treated by ball milling with limited water content. **Starch/Stärke**, v. 67, p. 772–779, 2015.

SHI, M. *et al.* Preparation, physicochemical properties, and in vitro digestibility of cross-linked resistant starch from pea starch. **Starch/Stärke**, v. 65, n. 11–12, p. 947–953, 2013.

SHIBATA, M. **Maturidade de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze: alterações fisiológicas, bioquímicas e conservação na pós-colheita.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

SHIBATA, M. *et al.* Physiological and physical quality of local *Araucaria angustifolia* seed variety. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 2, p. 249–256, 2016.

SHIBATA, M.; COELHO, C. M. M. Early harvest increases post-harvest physiological quality of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seeds. **Revista de Biologia Tropical**, v. 64, n. 2, p. 885–896, 2016.

SHIBATA, M.; COELHO, C. M. M.; STEINER, N. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. **Seed Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 214–224, 2013.

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.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos.** LTC ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, O. J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1–22, 2007.

SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

SINGH, A. V.; NATH, L. K. Synthesis and evaluation of physicochemical properties of cross-linked sago starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 655–660, 2011.

SINGH, A. V.; NATH, L. K. Synthesis and evaluation of physicochemical properties of cross-linked sago starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 14–18, 1 jan. 2012.

SOMARATNE, G. M. *et al.* Effect of polishing on glycemic index and antioxidant properties of red and white basmati rice. **Food Chemistry**, 2017.

SONG, J. Y.; PARK, J. H.; SHIN, M. The effects of annealing and acid hydrolysis on resistant starch level and the properties of cross-linked RS4 rice starch. **Starch/Stärke**, v. 63, n. 3, p. 147–153, 2011.

SORBA, A.; SOPADE, P. A. Changes in rapid visco-analysis (RVA) viscosity reveal starch digestion behaviours. **Starch/Stärke**, v. 65, n. 5–6, p. 437–442, 2013.

- SOUZA, M. *et al.* Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 24–37, 2014.
- SPADA, J. C. *et al.* Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1166–1173, 2012.
- SPADA, J. C. *et al.* Water adsorption isotherms of microcapsules with hydrolyzed pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch as wall material. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 1, p. 64–69, 2013.
- STAHL, J. A. *et al.* Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1206–1214, 2007.
- TAMAKI, S. *et al.* Structural change of maize starch granules by ball-mill treatment. **Starch/Stärke**, n. 8, p. 342–348, 1998.
- THYS, R. C. S. *et al.* Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p. 468–473, 2010.
- TOMASIK, P.; SCHILLING, C. H. Chemical Modification of Starch. In: DEREK HORTON (Ed.). **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. [s.l.] Academic Press, 2004. v. 59p. 175–403.
- WANG, S.; COPELAND, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. **Food & Function**, v. 4, p. 1564–1580, 2013.
- WANG, W. *et al.* Settling volume and morphology changes in cross-linked and unmodified starches from wheat, waxy wheat, and waxy maize in relation to their pasting properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 18–26, 2018.
- WARREN, F. J.; GIDLEY, M. J.; FLANAGAN, B. M. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure — a joint FTIR – ATR , NMR , XRD and DSC study. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 35–42, 2016.
- WATERSCHOOT, J. *et al.* Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. **Starch/Stärke**, p. 14–29, 2015.
- WILSON, O. J. *et al.* Cold spot microrefugia hold the key to survival for Brazil's Critically Endangered Araucaria tree. **Global Change Biology**, v. 00, p. 1–13, 2019.
- WONGSAGONSUP, R. *et al.* Zeta potential (ζ) and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. **Starch/Stärke**, v. 57, p. 32–37, 2005.
- WONGSAGONSUP, R. *et al.* Effect of cross-linking on physicochemical properties of tapioca starch and its application in soup product. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 656–665, 2014.
- WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Characterization of Pinhão Starch. Part I. Extraction and Properties of the Starch Granules. **Starch/Stärke**, v. 37, n. 7, p. 224–227, 1985.
- WU, D. *et al.* Effect of ball mill treatment on the physicochemical properties and digestibility

of protein extracts generated from scallops (*Chlamys farreri*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

WU, Y. *et al.* Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. **Food Research International**, v. 42, n. 2, p. 221–225, 2009.

WU, Y. *et al.* Pasting, thermal and rheological properties of rice starch in aqueous solutions with different catechins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2074–2080, 2015.

XIAO, H. *et al.* Inhibitory effects of green tea polyphenols on the retrogradation of starches from different botanical sources. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 8, p. 2177–2181, 2013.

XIE, Y. *et al.* Effects of cross-linking with sodium trimetaphosphate on structural and adsorptive properties of porous wheat starches. **Food Chemistry**, v. 289, p. 187–194, 2019.

YONEYA, T. *et al.* Influence of cross-linked potato starch treated with POCl₃ on DSC, rheological properties and granule size. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 447–457, 2003.

ZANETTE, F. **Enxertia da araucária para produção de Pinhão**. Disponível em: <<https://sistemafaep.org.br/wp-content/uploads/2014/08/FolderEnxertinhaAraucaria.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2017.

ZANETTE, F. *et al.* Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. [s.l: s.n.]. p. 13–40.

ZECHINI, A. A. **Morfometria, produção, fenologia e diversidade genética: subsídios para conservação da Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze e coleta sustentável do pinhão no Planalto Catarinense**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ZECHINI, A. A. *et al.* Produção, comercialização e identificação de variedades de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 74–82, 2012.

ZENG, F. *et al.* Physicochemical properties and digestibility of hydrothermally treated waxy rice starch. **Food Chemistry**, v. 172, p. 92–98, 2015.

ZHANG, G.; AO, Z.; HAMAKER, B. R. Slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3252–3258, 2006.

ZHANG, H. *et al.* Inhibition of wheat starch retrogradation by tea derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 413–417, 2015a.

ZHANG, W. *et al.* Effect of wet ball milling on physicochemical properties and crosslinking reaction performance of corn starch. **Starch/Stärke**, v. 67, n. 11–12, p. 958–963, 1 dez. 2015b.

ZHU, F. *et al.* Effect of phytochemical extracts on the pasting, thermal, and gelling properties of wheat starch. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 919–923, 2009.

ZHU, F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. **Trends in Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 1–17, 2015a.

ZHU, F. Interactions between starch and phenolic compound. **Trends in Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 129–143, 2015b.

ZHU, F.; WANG, Y. J. Rheological and thermal properties of rice starch and rutin mixtures. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 757–762, 2012.

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, 2017a.

ZORTÉA-GUIDOLIN, M. E. B. *et al.* Influence of Extrusion Cooking on In Vitro Digestibility, Physical and Sensory Properties of Brazilian Pine Seeds Flour (*Araucaria angustifolia*). **Journal of Food Science**, v. 82, n. 4, p. 977–984, 2017b.

ZORTÉA, M. E. B. *et al.* Avaliação da viscosidade aparente de pastas de amidos nos viscosímetros Brookfield RVDV-II+PRO e rápido visco-analisador RVA-4. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, n. 1, p. 326–335, 2011.

ANEXOS

**ANEXO A - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE
CIENTÍFICA - ICMBio**



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 53789-1	Data da Emissão: 23/05/2016 10:32	Data para Revalidação*: 22/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cleoci Beninca	CPF: 037.378.589-50
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO TERMOANALÍTICA, REOLÓGICA E ESTRUTURAL DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDOS DE PINHÃO (Araucaria angustifolia)	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	CNPJ: 80.257.355/0001-08

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de pinhões	04/2016	04/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SC	FLORESTA NACIONAL DE TRÊS BARRAS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Araucaria angustifolia

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Semente
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

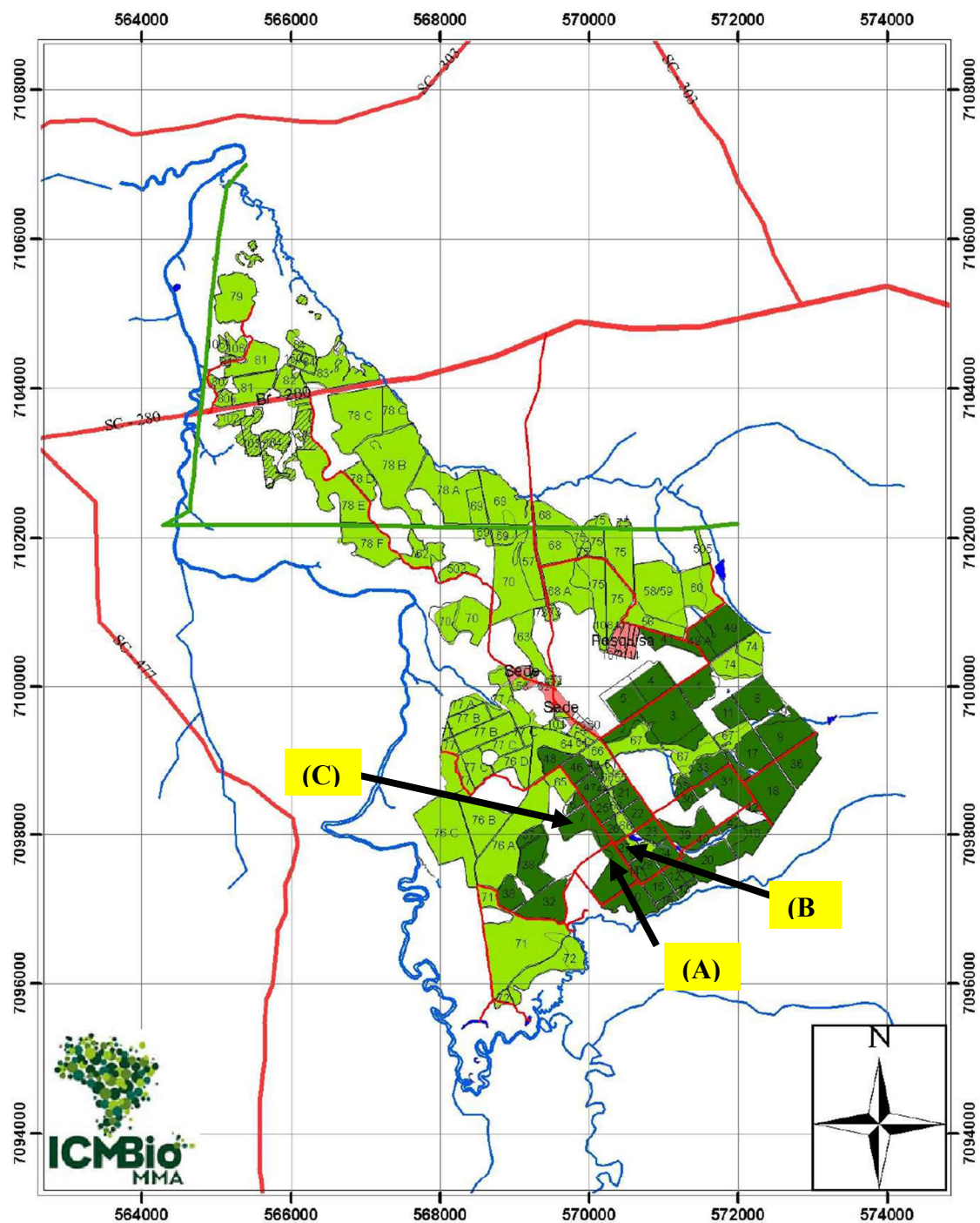
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87823747



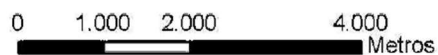
Página 1/4

**ANEXO B – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE PINHÃO NA FLONA
– TRÊS BARRAS**



TALHÕES DE PLANTIOS FLORESTAIS

Escala: 1:75.000



PARÂMETROS CARTOGRÁFICOS

Projeção Universal Transversa de Mercator

Meridiano Central 51° w

Origem das Coordenadas: 500.000, 10.000.000 metros

Datun Horizontal SIRGAS_2000

Elaboração: FLONA de Ibirama, FLONA de Três Barras e
Curso de Engenharia Florestal UNC Canoinhas

Março de 2010

**ANEXO C – PRIMEIRAS PÁGINAS DOS ARTIGOS PUBLICADOS E DAS
RESPECTIVAS LICENÇAS PARA REPRODUÇÃO**

Corn and *Pinhão* Starches Modified with Sodium Tripolyphosphate: Thermal, Pasting, Structural and Morphological Properties

Cleoci Beninca, Raíssa A. Barboza, Cristina S. de Oliveira, Camila D. Bet, Radla Z. B. Bisinella, and Egon Schnitzler*

Pinhão and corn starches are submitted to phosphating with sodium tripolyphosphate and their properties are evaluated by thermogravimetry, differential scanning calorimetry, viscoamylography, X-ray powder diffractometry, field emission gun-scanning electron microscopy analysis. The phosphating process is divided into three steps to analyse the behaviour of the sample on exposure to phosphate groups. After the modification, there is a decrease in the transition temperatures and gelatinisation enthalpy of both starches. During the three phases of phosphating, small differences are observed in the thermal stability of the modified samples, but a lower value is obtained for corn starch after the third stage. The decrease in pasting temperature is accompanied by an increase in the peak viscosity of the starch suspensions, however, higher values for setback and breakdown are also recorded. The degree of relative crystallinity of the phosphated starches increases, and from microscopy it is possible to observe the presence of crystals of sodium tripolyphosphate during phosphating process.

1. Introduction

Starch is a widely applied ingredient in the food, chemical, pharmaceutical and paper industries, being extracted mainly from corn, cassava, wheat and potatoes.^[1] Several studies have been carried out to find new sources of unconventional starch that present characteristics of industrial interest. *Pinhão* seeds (*Araucaria angustifolia*) presents ≈70% of its dry weight of starch, easily extracted from the pulp by aqueous processes, factors that make it attractive for processing in a pilot plant and commercial scale.^[2,3]

C. Beninca, R. A. Barboza, C. S. de Oliveira, C. D. Bet,
R. Z. B. Bisinella, E. Schnitzler
State University of Ponta Grossa (UEPG)
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, 84030-900 Ponta Grossa, PR,
Brazil
E-mail: egons@uepg.br
C. Beninca
Federal Institute of Education, Science and Technology of Santa
Catarina (IFSC)
Av. Expedicionários, 2150 - Campo da Água Verde, 89460-000
Canoinhas, SC, Brazil

DOI: 10.1002/star.201800290

The starch is composed of two different glucose polymers: amylose and amylopectin.^[4–7] Besides, can be found lipids, minerals and nitrogenated compounds, which may influence the starch characteristics.^[4] Among the minerals, phosphorus appears to have greater influence on the technological properties of starch.^[9]

Starch from some botanical sources naturally presents phosphorus content.^[8–10] However, phosphate groups can also be covalently linked to amylopectin molecules, most of them as monoesters at the C-6 and C-3 positions of glucose units.^[8,11] They can be traditionally prepared by reaction of granular starch with sodium tripolyphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), sodium orthophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), phosphoryl chloride (POCl_3) or sodium trimetaphosphate ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$).^[10,12] This process is considered as a chemical modification, where the physicochemical properties of the native

starch can undergo considerable changes by the introduction of substituent groups on the starch molecule.^[2,3,13–16]

The chemical and functional properties of the crosslinked starches depend on the starch source, the type and concentration of the reagent, and the reaction conditions (time, temperature, pH, presence of catalyst).^[17]

Phosphating by sodium tripolyphosphate (STPP) has been employed due to its ability to promote changes in the properties of starch with a controlled substitution degree, and because it presents low cost.^[18] Although several botanical sources of starch have been studied after phosphating,^[4,8,10–12,16,17] the objective of this study was to investigate the effect of sodium tripolyphosphate on the thermal, pasting, structural and morphological properties of corn and *pinhão* starches.

2. Experimental Section

A. angustifolia seeds were collected in June, 2016, at Três Barras National Forest-SC-Brazil, with the Authorization for Activities for Scientific Purpose no. 53789-1, approved by the Biodiversity Information and Authorization System – SISBIO.

Pinhão starch was extracted according to the methodology described by Costa et al.,^[15] which comprises the steps of peeling, removal of the seed coatings and the embryo, crushing,

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This Agreement between Ms. Cleoci Beninca ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 4585390096268

License date May 10, 2019

Licensed Content
Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content
Publication Starch

Licensed Content
Title Corn and Pinhão Starches Modified with Sodium Tripolyphosphate:
Thermal, Pasting, Structural and Morphological Properties

Licensed Content
Author Cleoci Beninca, Raissa A. Barboza, Cristina S. de Oliveira, et al

Licensed Content
Date Mar 28, 2019

Licensed Content
Volume 0

Licensed Content
Issue 0

Licensed Content
Pages 8

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type Author of this Wiley article

Effect of Ball Milling Treatment on Thermal, Structural, and Morphological Properties of Phosphated Starches from Corn and Pinhão

Cleoci Beninca, Cristina Soltovski de Oliveira, Camila Delinski Bet, Radla Zabian Bassetto Bisinella, Caroline Gaglieri, and Egon Schnitzler*

In the previous study, the effect of chemical modification with sodium tripolyphosphate on the properties of corn and pinhão starches was evaluated. However, physical modifications also confer specific characteristics on the starch, diversifying its application. Thus, in this study, thermal (thermogravimetry [TG], differential exploratory calorimetry [DSC]), structural (X-ray powder diffractometry [XRD], Fourier-transform infrared [FTIR]) and morphological (field emission gun-scanning electron microscopy) properties of native and phosphated corn and pinhão starches are evaluated before and after ball milling treatment. In addition, wavelength dispersive X-ray spectroscopy is applied as a new technique to measure the level of phosphorus and sodium. The incorporation of phosphate groups in starches is confirmed and phosphorus and sodium are reduced after milling. The doubly modified starches show lower moisture retention capacity and lower thermal stability. All treatments reduce the gelatinization enthalpy mainly for double modified starches. Relative crystallinity is drastically reduced after the double modification. Changes in FTIR results are more pronounced after the physical treatment, corroborating with DSC and XRD results. Morphological changes are observed only in the milled samples. Thus, the double modification confer greater changes compared to the isolated modifications.

1. Introduction

Araucaria angustifolia seed, called pinhão, is an unconventional source of starch.^[1,2] The proximal composition of the seed reveals its great nutritional value. In addition to starch, which represents about 64% of its weight, pinhão seed contains approximately 6.4% of protein, 1.0% of lipids, 5.2% of fibers, and 2.5% of ashes (dry basis).^[3]

Among the minerals found in starch, phosphorus seems to promote great differences in physical and chemical properties.^[1,4] So, differentiated characteristics for industrial uses can be achieved by varying the phosphorus content in starches with the chemical modification.^[1,5–9]

In our previous study,^[1] pinhão starch was chemically modified with sodium tripolyphosphate (STPP) and its pasting, thermal, morphological, and structural properties were evaluated. Phosphating decreased the pasting temperature and enthalpy but increased the final viscosity and the relative crystallinity (RC) of pinhão starch. No change in the size or shape of the starch was observed after treatment.

In addition to chemical treatments, physical modification can also provide desirable properties for starch.^[2] In relation to the changes caused, it is known that the treatment by ball milling destroys the granular structure of starch due to collision, shear, and friction generated during the process.^[10,11] Thus, it has been applied in four ways: 1) as a single physical modification process,^[10,12–16] 2) as a post-treatment of partial hydrolysis of the starch granule, improving the grinding efficiency,^[17] 3) as a pre-treatment for chemical modifications of starch in order to improve the reaction efficiency,^[18,19] and 4) together with the chemical modification.^[18,20,21]

Zhang et al.^[19] verified the effect of ball milling on the efficiency of corn starch phosphating. Initially, they performed the treatment of starch in a ball mill in ethanol solution. The ground starch was then cross-linked with sodium trimetaphosphate (STMP). The double modification, in this order, promoted greater interaction of the reaction reagent and increased the cross-linking effect. They did not relate the effect of this physical modification on cross-linked starch.

Dr. C. Beninca, Dr. C. S. de Oliveira, C. D. Bet, Dr. R. Z. B. Bisinella, Dr. E. Schnitzler
State University of Ponta Grossa (UEPG)
Av. Carlos Cavalcanti, 4748—Uvaranas
Ponta Grossa, PR 84030-900, Brazil
E-mail: egons@uepg.br

Dr. C. Beninca
Federal Institute of Education
Science and Technology of Santa Catarina (IFSC)
Av. Expedicionários, 2150—Campo da Água Verde
Canoinhas, SC 89460-000, Brazil

C. Gaglieri
Paulista State University—UNESP—Campus Bauru
Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01—Vargem Limpa
Bauru, SP 17033-360, Brazil

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/star.201900233>

DOI: 10.1002/star.201900233

RightsLink - Your Account

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This Agreement between Ms. Cleoci Beninca ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4758880011464
License date	Jan 30, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Starch
Licensed Content Title	Effect of Ball Milling Treatment on Thermal, Structural, and Morphological Properties of Phosphated Starches from Corn and Pinhão
Licensed Content Author	Cleoci Beninca, Cristina Soltovski Oliveira, Camila Delinski Bet, et al
Licensed Content Date	Jan 13, 2020
Licensed Content Volume	0
Licensed Content Issue	0
Licensed Content Pages	11
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	portuguese
Title of your thesis / dissertation	AMIDO DA SEMENTE DA Araucaria angustifolia: CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICA E FÍSICA E DA INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO NAS SUAS PROPRIEDADES
Expected completion date	Nov 2019
Expected size (number of pages)	1
Requestor Location	Ms. Cleoci Beninca Av. Expedicionários, 2150 Campo da Água Verde Canoinhas, Santa Catarina 89460-000 Brazil Attn: Ms. Cleoci Beninca
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.



Effect of aqueous and ethanolic extracts from *pinhão* coats on the properties of corn and *pinhão* starches

Cleoci Beninca^{1,2} · Radla Zabian Bassetto Bisinella² · Camila Delinski Bet² · Cristina Soltovski de Oliveira² · Raíssa Arantes Barboza² · Tiago André Denck Colman³ · Ivo Mottin Demiate² · Egon Schnitzler²

Received: 22 March 2019 / Accepted: 6 September 2019
 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Abstract

The *Araucaria angustifolia* seed, named *pinhão*, has a high content of carbohydrates, and it is considered an unconventional starch source. Its coats are rich in phenolic compounds, which can be easily extracted with some solvents. This study presents a method of aqueous and ethanolic extraction of phenolic compounds from *pinhão* coats and its incorporation into corn and *pinhão* starches. Thermogravimetry, differential scanning calorimetry, X-ray powder diffractometry, Fourier-transform infrared spectroscopy and field emission gun-scanning electron microscopy were applied to evaluate the thermal, structural and morphological properties of starches. The control samples were prepared under the same conditions, with deionised water and ethanol/water 55:45 v/v, without extracts. Starches incorporated with both extracts showed lower thermal decomposition temperatures than the native ones. The gelatinization enthalpy (ΔH_{gel}) of corn starch decreased after incorporation with extracts. The ΔH_{gel} of native *pinhão* starch was 7.3 J g⁻¹. A higher ΔH_{gel} was observed after treatment with ethanolic extract, while the aqueous extract caused a decrease in this value. Treatments did not change the diffraction patterns but change the relative crystallinity (RC) of starches, except to the samples treated with ethanol/water 55:45 v/v that maintained RC similar to the native ones. There was a good correlation of FTIR data with RC and ΔH_{gel} . After incorporation with ethanolic extract, the *pinhão* starch showed superficial peeling. No change was observed in morphological characteristics for the other samples. Results indicate that there is an interaction between the phenolic compounds of the *pinhão* coats and the starch.

Keywords *Araucaria angustifolia* · Phenolic compounds · Gelatinization · Thermal analysis

Introduction

The seed of *Araucaria angustifolia*, known as *pinhão*, is formed by external coating, internal tegument, almond or pulp, and embryo (Fig. 1). Its mass comprises around 7–9 g/seed, and the coat represents about 22% of the total [1–3].

It is estimated that about 10 tons of *pinhão* coats is discarded annually in Brazil. Due to the long period of decomposition, studies aiming at a better utilization of this residue have been performed [4].

The high content of starch (70% of the almond mass, dry basis) [5], added to the simple and high yield method in the extraction of this polysaccharide, encourages its use for processing in a pilot plant and on a commercial scale [2].

The *pinhão* coat is cited as a source of phenolic compounds, which have antioxidant properties and potential biological activity [6]. The beneficial properties of these compounds may be attributed to their ability to sequester free radicals, producing effects on the prevention and treatment of cardiovascular diseases, cancer, renal and hepatic impairment [7, 8].

These compounds can migrate from coats to the almond during cooking in water or can be extracted in the presence

✉ Egon Schnitzler
egons@uepg.br

¹ Federal Institute of Education, Science and Technology of Santa Catarina (IFSC), Av. Expedicionários, 2150, Canoinhas, SC 89460-000, Brazil

² State University of Ponta Grossa (UEPG), Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Ponta Grossa, PR 84030-900, Brazil

³ Federal University of Grande Dourados (UFGD), R. João Rosa Góes, 1761, Dourados, MS 79825-070, Brazil

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This Agreement between Ms. Cleoci Beninca ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4703630023381
License date	Nov 07, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Journal of Thermal Analysis and Calorimetry
Licensed Content Title	Effect of aqueous and ethanolic extracts from pinhão coats on the properties of corn and pinhão starches
Licensed Content Author	Cleoci Beninca, Radla Zaban Bassetto Bisinella, Camila Delinski Bet et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1