

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LUCAS STIEGLER RIBEIRO

AVALIAÇÃO TÉRMICA, REOLÓGICA E ESTRUTURAL DE BAGAÇO DE PINHÃO
(*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze) TRATADO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO

PONTA GROSSA

2015

LUCAS STIEGLER RIBEIRO

AVALIAÇÃO TÉRMICA, REOLÓGICA E ESTRUTURAL DE BAGAÇO DE PINHÃO
(*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze) TRATADO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO

Dissertação apresentada como requisito de obtenção
do título de Mestre 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.Marcelo Lazzarotto

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

R484 Ribeiro, Lucas Stiegler
Avaliação térmica, reológica e
estrutural de bagaço de pinhão (*Araucaria
angustifolia* (Bert.) O. Ktze) tratado com
complexo enzimático/ Lucas Stiegler
Ribeiro. Ponta Grossa, 2015.
43f.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Lazzarotto.

1.Bagaço de pinhão. 2.Enzimas.
3.Análises térmicas. 4.Perfil reológico.
5.Análise reológica. I.Lazzarotto,
Marcelo. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 664.7

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCAS STIEGLER RIBEIRO

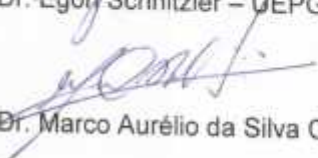
**AVALIAÇÃO TÉRMICA, REOLÓGICA E ESTRUTURAL DE BAGAÇO
DE PINHÃO (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze) TRATADO COM
COMPLEXO ENZIMÁTICO.**

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

Orientador:


Prof. Dr. Marcelo Lazzarotto – EMBRAPA


Prof. Dr. Egon Schnitzler – UEPG


Prof. Dr. Marco Aurélio da Silva C Filho – U POSITIVO

Ponta Grossa, 02 de junho de 2015.

Essa dissertação é dedicada aos meus pais, pelo incentivo a educação

Aos meus amigos de mestrado, principalmente Layse do Prado Cordoba por todo o
apoio

Aos meus orientadores, pela evolução como pesquisador

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a Deus por todas as bênçãos com que fui agraciado durante toda minha vida.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, pai e meu irmão por todo o suporte durante essa jornada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lazzarotto que me acompanhou durante o processo de elaboração deste documento, com várias sugestões e suporte constante.

Ao Prof. Dr. Egon Schnitzler, que atuou como meu co-orientador, mas principalmente como tutor e amigo, sempre solícito e disposto a ajudar e lapidar o conhecimento.

À minha amiga mestrande Layse, que me acompanha desde o período de iniciação científica e sempre me ajudou em todas as atividades desenvolvidas.

Aos professores e funcionários do DEA, MESCTA e LABMU que de alguma forma contribuíram para minha formação e meus êxitos.

Aos professores Drs. Luiz Gustavo Lacerda e Marco Aurélio da Silva Carvalho Filho, da Universidade Positivo, pelo auxílio nas análises e uso de equipamentos.

À Prof^a Dr^a Neiva Deliberati Rosso que coordenou as etapas iniciais da elaboração deste trabalho, permitindo seu desenvolvimento pleno.

RESUMO

O bagaço de pinhão, resíduo decorrente da extração do amido desta semente, tem características reológicas similares ao produto principal. Muitas modificações em amidos foram investigadas de várias origens botânicas. As modificações enzimáticas têm sido extensivamente estudadas devido ao seu potencial de formar produtos com o mínimo de desperdício. Esse estudo teve como objetivo caracterizar e modificar o bagaço de Pinhão obtido após a extração do amido, usando tratamento enzimático por 12, 24 e 36h. Os resultados da composição centesimal foram muito similares entre as amostras tratadas e não tratadas. Por meio das curvas TG-DTA foram observadas as três etapas características da perda de massa para amostras de amido, confirmando a complexidade da degradação pela aparência de uma deformação assimétrica (ombro) nessas amostras. No DSC foi observado um aumento no valor de T_o e uma diminuição de T_p , T_c e ΔH_{gel} para as amostras modificadas. Na análise RVA foi observado um aumento na retrogradação depois da modificação. A maioria dos difratogramas das amostras de bagaço de pinhão foram semelhantes aos padrões de amido do tipo 'A', característico de cereais, como milho e trigo. As micro-imagens MEV confirmaram o isolamento dos grânulos de amido dos outros compostos, como fibra e proteína, que estão presentes na amostra nativa. O tratamento enzimático possibilitou a aproximação das propriedades do bagaço às do amido de pinhão, com semelhança entre as propriedades estudadas. Com os resultados apresentados pode-se afirmar que esta técnica de tratamento do bagaço do pinhão pode agregar valor a essa biomassa, o que poderá aumentar o rendimento de amido extraído da semente da Araucária.

Palavras-chave: Bagaço de pinhão, enzimas, análises térmicas, perfil reológico, análise reológica, composição centesimal, mudança estrutural.

ABSTRACT

The "Pinhão" bagasse, a residue from the starch extraction, has similar rheological characteristics to the main product. Many sources of starch modifications are investigated for various botanical sources, and worth mentioning, the enzymes modifications have been extensively studied due to their potential to form products with minimal waste. The study aims to characterize and modify the "Pinhão" bagasse, obtained after the starch extraction, using enzymatic treatment at different times. The centesimal composition results were very similar between the treated and untreated samples. Through the TG-DTA curves, it was observed the three characteristic steps of starch samples and confirmed their degradation complexity by the appearance of an asymmetric deformation ("shoulder") in some samples. DSC had an increase in the T_0 and a decrease of T_p , T_c and ΔH_{gel} for the modified samples. In RVA it was observed an increase of retrogradation after the modification. Most of the X-ray diffractograms of the "pinhão" bagasse samples have shown starch A-type pattern. The SEM was confirmed an isolation of the starch granules of other compounds as fibre and protein, which were present in the native sample. The enzymatic treatment approached the properties of the bagasse to ones of the "pinhão" starch, with similarities among the studied properties. With the obtained results, it can be affirmed that this treatment technique of the "pinhão" bagasse may aggregate value to this biomass, which will increase the efficiency of the starch extracted from the Araucaria seed.

Keywords: "pinhão" bagasse, enzymes, thermal analysis, rheological profile, rheological analysis, centesimal composition, structural change.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura linear da amilose.....	16
Figura 2. Estrutura da amilopectina.....	17
Figura 3. Micro-imagens do MEV para bagaço de pinhão	19
Figura 4. Difratoograma e parâmetros para cálculos de cristalinidade.....	25
Figura 5. Curvas TG-DTA das amostras de bagaço nativo e tratadas	30
Figura 6. Curvas DSC das amostras de bagaço nativo e tratadas.....	32
Figura 7. Perfis RVA das amostras de bagaço nativo e tratadas.	33
Figura 8. Difratogramas XRD das amostras de bagaço nativo e tratadas.....	35
Figura 9. Micro-imagens de MEV das amostras de bagaço nativo e tratadas	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Umidade (%) e composição aproximada (g/100g amido seco) de sementes de pinhão descascada e amido isolado.	18
Tabela 2. Composição centesimal das amostras nativa e modificadas.	27
Tabela 3. Resultados de TG e DTA das amostras: (A) bagaço não-tratado de Pinhão e bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por (B) 12 h, (C) 24h e (D) 36h.	29
Tabela 4. Resultados das análises DSC, MEV e XRD de: (A) bagaço não-tratado de Pinhão e bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por (B) 12 h, (C) 24h e (D) 36h.	31
Tabela 5. Resultados do RVA para as amostras: (A) bagaço não-tratado de pinhão e bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por (B) 12 h, (C) 24h e (D) 36h.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cP	Centipoises
D _a	Diâmetro médio
DSC:	Calorimetria exploratória diferencial
DTA:	Análise térmica diferencial
MEV/SEM:	Microscopia eletrônica de varredura/ <i>Scanning electron microscopy</i>
RVA:	Rápido visco análise
T _c	Temperatura de conclusão
TG:	Termogravimetria
T _o	Temperatura “onset” inicial
T _p	Temperatura de pico
XRD	Difratometria de raio-X
ΔH _{gel}	Entalpia de gelatinização

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 Amido	14
3.1.1 Amido de pinhão	14
3.1.2 Extração do amido	15
3.1.3 Estrutura química.....	15
3.1.3.1 Amilose	16
3.1.3.2 Amilopectina	16
3.1.4 Propriedades reológicas	17
3.1.5 Demais componentes	18
3.2 Bagaço de pinhão.....	19
3.3 Modificações de amidos e subprodutos.....	20
3.3.1Amidos modificados por tratamento enzimático	20
3.3.1.1 Enzimas utilizadas.....	20
3.3.2 Aplicação da modificação no resíduo da extração de amido	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Obtenção da amostra	22
4.2 Tratamento enzimático	22
4.3 Composição centesimal.....	23
4.4 Análises térmicas.....	23
4.4.1 Termogravimetria (TG) e Análise térmica diferencial (DTA)	23
4.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	24

4.5	Análise reológica (RVA).....	24
4.6	Análises estruturais	24
4.6.1	Difratometria de raios X (XRD)	24
4.6.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	25
4.6.3	Análise estatística	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Composição centesimal.....	27
5.2	Termogravimetria e Análise térmica diferencial (TG-DTA).....	28
5.3.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	31
5.4	Análise reológica (RVA).....	33
5.5	Difração de Raios-X (XRD).....	34
5.6.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	36
6.	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm sido realizadas acerca de novas fontes de amidos, além de obtenção de novos tipos a partir de modificações diversas. Fontes clássicas como mandioca e milho são destaque, com vários artigos publicados, sendo seu uso amplamente difundido na indústria alimentícia (CLADERA et al., 2006). Em geral, as modificações envolvem o uso de agentes ácidos, alcalinos ou oxidantes. Esses tratamentos produzem um resíduo com tratamento custoso, uma vez que é necessário um tempo elevado para a estabilização, além do uso de produtos químicos (BICUDO et al., 2009).

O amido obtido a partir do pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze), semente de uma árvore típica da região sul do Brasil, já foi estudado em alguns trabalhos publicados em revistas da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porém avaliações sobre modificações na sua estrutura, e como estas podem influenciar o comportamento térmico e reológico desses amidos, ainda são escassas quando comparadas com as fontes de amidos mais utilizadas (CORDENUNSI et al., 2004).

A extração de diversos tipos de amido resulta, na maioria dos casos, em um resíduo conhecido como bagaço. Alguns amidos, como de milho, geram subprodutos durante sua extração, que já possuem diversas aplicações. O bagaço, além da quantidade elevada de umidade, contém uma considerável porção de amido em sua estrutura (SEVERO et al., 2010).

Nesse contexto há a necessidade crescente de valorização dos produtos provenientes das Araucárias, árvores de grande importância e ameaçadas de extinção, e aproveitamento de resíduos que possam apresentar propriedades de interesse para os diversos tipos de indústria (alimentícia, de papel e farmacêutica, por exemplo). Neste trabalho é proposto tratamento enzimático do bagaço resultante da extração do amido de pinhão e sua caracterização via análises térmicas, reológicas e estruturais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o bagaço obtido da extração de amido de pinhão na forma nativa e modificado enzimaticamente.

2.2 Objetivos específicos

Realizar extração e tratamento enzimático do bagaço obtido pós-extração de amido de pinhão nos tempos 12, 24 e 36h;

Caracterizar o bagaço de pinhão nativo e tratado enzimaticamente, utilizando:

- Análises físico-químicas (Composição centesimal);
- Técnicas termoanalíticas (Calorimetria exploratória diferencial – DSC, Termogravimetria e Análise térmica diferencial - TG-DTA);
- Estudos reológicos (Rápido visco-análise – RVA);
- Técnicas estruturais (difratometria de raios X - XRD e Microscopia eletrônica de varredura – MEV).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Amido

O amido é fundamentalmente um polímero de glucose, com cadeia de tamanhos variados, presente como substância de reserva nos vegetais. É a principal fonte de carboidratos e apresenta papel primordial na alimentação humana (BICUDO et al., 2009). Está presente na maior parte dos produtos de origem vegetal, com destaque para os amidos de milho e mandioca, com grande produção mundial (CASTAÑO et al., 2012).

A estrutura do amido é dividida em duas partes: amilose e amilopectina. A amilose apresenta cadeia linear de glucose, ligações α 1-4 e cadeia com valores entre 200 e 700 unidades. Já a amilopectina apresenta ligações α 1-4 e α 1-6, o que confere uma estrutura altamente ramificada, além da presença de 2000 ou mais unidades de glucose. Cada uma delas confere propriedades distintas ao amido e suas proporções dependem principalmente da origem botânica. De forma geral os teores de amilose e amilopectina, respectivamente, variam de 20 a 25% e 75 a 80%. Porém esses valores variam como nos amido cerosos que não possuem amilose em sua estrutura (PARKER; RING, 2001).

3.1.1 Amido de pinhão

A semente do pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze) possui o amido como principal componente, sendo que este representa $84,0 \pm 0,6$ % da matéria seca da semente. As frações dos demais macro-componentes são: $7,81 \pm 0,30$ % de proteínas; $4,51 \pm 0,10$ % de fibra e $1,11 \pm 0,10$ % de lipídeos. A estrutura química do amido do pinhão apresenta teores de amilose e amilopectina, respectivamente, 42% e 58% (HENRÍQUEZ et al., 2008).

A extração do amido de pinhão é relativamente simples e não exige a presença de aditivo, como o hidróxido de sódio, utilizado na obtenção de amido de milho. O amido de pinhão apresenta baixo conteúdo de fibras, proteínas, lipídeos e cinzas, o que facilita sua aplicação em diversos tipos de alimentos, sendo um bom substituto para fontes convencionais de amido no ponto de vista tecnológico (CASTAÑO et al., 2012). Segundo Cordenunsi et al (2004) a ingestão de amido de

pinhão tem baixa influencia sobre o índice glicêmico (*Glycemic Index* – GI) o que torna esse alimento indicado para pacientes com diabetes. Ainda neste trabalho, destaca-se a presença importante de minerais Mg e Cu, além de valores 23% menores de resposta de índice glicêmico das sementes de pinhão cozidas em comparação com pão branco.

3.1.2 Extração do amido

O processo de extração de amido envolve diversas operações unitárias. Todas as etapas devem ser realizadas de forma a maximizar o rendimento e diminuir possíveis fontes de contaminação, uma vez que é necessária uma quantidade elevada de água, elevando o risco de deterioração do produto (BELLO-PÉREZ et al., 2006).

Inicialmente é realizado o descascamento do produto, para retirada da casca ou pericarpo. Pode ser por processo mecânico ou automatizado. A próxima etapa envolve maceração, que pode ocorrer por via seca ou úmida, como no caso da mandioca e do milho, respectivamente. Essa também é aplicada à extração de amido de pinhão, com formação de duas fases, com acúmulo de amido no fundo, facilmente separado por filtração simples (CONFORTI; LUPANO, 2007).

A etapa final para obtenção do amido é o peneiramento em malhas especiais para retirada de proteínas e fibras. Depois de filtrado, o produto passa pelo processo de secagem, a baixa temperatura (inferior a de gelatinização) evitando uma pré-modificação do amido, além de aumentar a durabilidade do produto (devido à estabilização da umidade) (LIU, 2005).

3.1.3 Estrutura química

Do ponto de vista químico, o amido é um polímero natural composto por subunidades de glicose, hexose básica para o metabolismo nos organismos aeróbios (PINTO et al., 2012). As ligações presentes nesse composto são chamadas de glicosídicas, podendo ser α 1-4 ou α 1-6, sendo esses números relativos aos carbonos ligantes da primeira e segunda molécula (CONFORTI; LUPANO, 2008).

As ligações glicosídicas estão presentes de maneiras diferentes na estrutura do amido, sendo que existem duas porções distintas: a amilose, mais linear e com

ligações α 1-4; e a amilopectina, com ramificações e ligações α 1-4 e α 1-6. Uma reação característica do amido envolve o reagente Lugol, a base de iodeto de potássio, que é capaz de colori-lo. Esta cor pode ser azul, quando há presença de amilose e vermelho quando há apenas amilopectina (amidos cerosos) (DAUDT et al., 2013).

3.1.3.1 Amilose

A amilose, fração essencialmente linear presente no amido, é constituída de moléculas de glucose (α -D-glicopirranose) e ligações glicosídicas α 1-4. Constituída de 200 a 700 unidades de monômeros de glucose, apresenta cadeia com tamanho menor quando comparada a amilopectina, cor azul na reação com Lugol e alguns grupamentos fosfato presentes, eventualmente, no carbono 6 da glucose (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

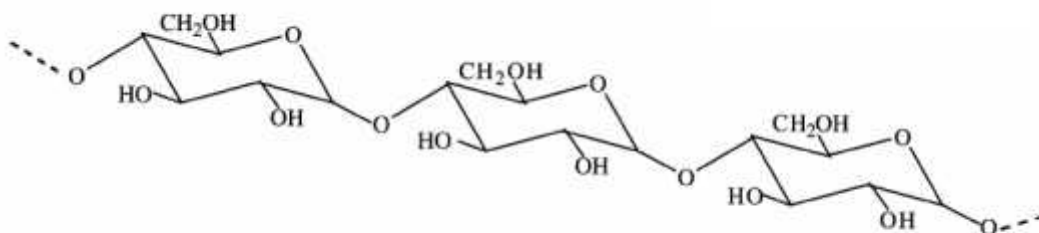


Figura 1. Estrutura linear da amilose

Fonte: SOUZA, 2010.

As hidroxilas presentes na amilose conferem um caráter hidrofílico a partes dessa molécula (COSTA et al., 2013). A linearidade dessas estruturas favorece, em soluções aquosas, a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, o que reduz a afinidade com a água, intensificando a formação de pastas opacas e o processo de sinérese (LEITE et al., 2008).

3.1.3.2 Amilopectina

A amilopectina, fração essencialmente ramificada presente no amido, é constituída de moléculas de glucose (α -D-glicopirranose) e ligações glicosídicas α 1-4 e α 1-6. Constituída por mais de 2000 unidades de monômeros de glucose, apresenta cadeia com tamanho elevado quando comparada a amilose, cor vermelha na reação com Lugol (LALITHA et al, 2012).

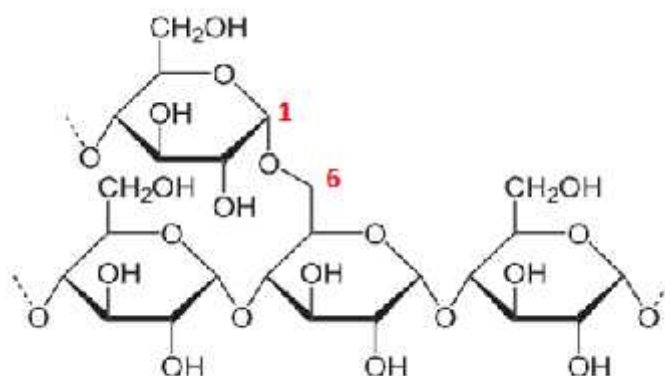


Figura 2. Estrutura da amilopectina

Fonte: STATIC, 2003.

As cadeias de amilopectina são classificadas em três categorias: A, B e C. As cadeias do tipo A não apresentam terminais redutores, são unidas por ligações α 1-4, ligando-se as cadeias do tipo B por ligações α 1-6. As cadeias do tipo B são compostas por ligações α 1-4 e α -1-6 e também podem estar ligados por grupos hidroxila primários, não apresentando terminal redutor. (DENARDIN e SILVA, 2009). A cadeia do tipo C é única, apresenta ligações α 1-4 e α -1-6 e terminal redutor. A amilopectina tem uma importância muito grande na estrutura do amido, uma vez que é suficiente para formação dos grânulos, sendo que a fração de amilose normalmente está disposta entremeadada na fração ramificada (STAHL et al., 2006).

3.1.4 Propriedades reológicas

O amido possui características peculiares do ponto de vista reológico. Em contato com água e, na maioria dos casos, calor é capaz de formar gel, que apresenta elevada viscosidade. Além disso, possui capacidade de absorção de água no interior da estrutura, conferindo aumento de viscosidade nos produtos (CONTO et al., 2011).

O processo de retrogradação também merece destaque, com reorganização da estrutura (devido à diminuição da energia das moléculas de amido) baseada nas ligações de hidrogênio, com aumento de viscosidade, formação de redes cristalinas e opacidade. A sinérese é um processo concomitante que ocorre pós-resfriamento do amido e resulta na liberação de água que está no interior da estrutura do gel (KLEIN et al., 2013; PARKER; RING, 2001).

3.1.5 Demais componentes

A semente de pinhão possui alguns outros compostos importantes, como proteínas e fibras alimentares. Esses macronutrientes são fundamentais para alimentação humana, no que diz respeito a toda estruturação celular e o bom funcionamento do intestino, respectivamente (CONFORTI; LUPANO, 2008; LEITE et al., 2008). Segundo Leite et al. (2008) dietas a base de farinha de pinhão cozida a 80 °C por 16 horas tendem a ter resultados semelhantes, em relação a incorporação de proteína, a dietas baseadas em caseína, como as presentes no leite por exemplo.

A Tabela 1 ilustra bem o citado, com teores considerados como fontes de proteínas e fibras, segundo o Ministério da Saúde (1998).

Tabela 1. Umidade (%) e composição aproximada (g/100g amido seco) de sementes de pinhão descascada e amido isolado.

	Semente de pinhão (%)	Amido (%)
Umidade	42,72 ± 0,28	10,84 ± 0,03
Cinzas	2,15 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Lipídeos	1,11 ± 0,08	0,34 ± 0,06
Proteína	7,81 ± 0,35	0,94 ± 0,10
Fibra bruta	4,51 ± 0,16	1,19 ± 0,09
Extrato não-nitrogenado	84,30 ± 0,61	97,49 ± 0,01

^a Médias de 4 replicas ± desvio

Fonte: Adaptado de HENRÍQUEZ et al., 2008.

A atividade antioxidante das sementes de pinhão crua e cozida também foi estudada, com destaque para presença de catequina. Os autores quantificaram uma forte migração de compostos antioxidantes presentes na casca (ácido gálico de quercetina) para a semente (KOEHNLEIN et al., 2012) .

3.2 Bagaço de pinhão

Normalmente tratado como resíduo, assim como bagaço de mandioca e outros, o bagaço de pinhão possui uma quantidade elevada de amido presente entre as fibras, além de praticamente toda proteína presente na semente de pinhão. Os elevados teores de fibra encontrados diminuem a aceitação sensorial desses produtos e posteriormente sua aplicação em formulações alimentícias, sendo, na maioria dos casos, destinado à alimentação animal (THYS et al., 2013).

A presença de fibras e proteínas, decorrente do processo de decantação e filtração, pode ser comprovada de diversas formas, como a composição centesimal por exemplo. Porém, análises estruturais como MEV (Microscopia de varredura eletrônica – Fig. 3) também podem colaborar com esta afirmação.

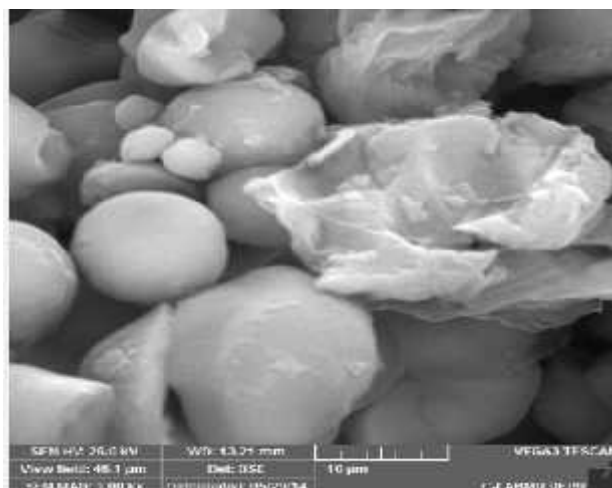


Figura 3. Micro-imagens do MEV para bagaço de pinhão

Fonte: o autor.

Observam-se estruturas típicas de grânulos de amido, formas arredondadas, assim como outras transparentes e com diferença de tonalidade e forma, que indicam presença de fibras e proteínas.

Destinos mais nobres são estudados para esses subprodutos da extração de amido. Pesquisas são realizadas para modificação de amidos puros, e como o bagaço possui quantidade elevada deste constituinte é possível correlacionar esses estudos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado (RIBEIRO et al., 2014).

3.3 Modificações de amidos e subprodutos

As modificações em amidos nativos têm o intuito de promover mudanças na estrutura destes, principalmente nas propriedades reológicas, uma vez que esses produtos são utilizados como espessantes e estabilizantes (CLADERA et al., 2006). Estas modificações podem ser provocadas por: aplicação de ácidos, pré-aquecimentos, agentes oxidantes e, mais recentemente, utilização de enzimas amilolíticas.

A aplicação de agentes ácidos, como o ácido clorídrico e láctico, envolve reações de hidrólise, onde são geradas cadeias de glicose de vários tamanhos, dependendo da concentração e da força do ácido utilizado. Os amidos desse tipo têm necessariamente menor viscosidade aparente quando comparados com suas formas nativas (FRANCO et al., 2010).

Tratamentos com a utilização de calor promovem a formação de amidos conhecidos como pré-gelatinizados. Esses amidos têm a característica de fornecer maior viscosidade aos produtos mesmo a frio (EL-DASH; CLERICI, 2008). O uso de agentes oxidantes como: permanganato, hipoclorito e peróxido promovem a quebra das ligações glicosídicas pela ação oxidante desses compostos (FRANCO et al., 2010).

3.3.1 Amidos modificados por tratamento enzimático

Essa modificação merece destaque devido ao seu aspecto ambiental, uma vez que o tratamento enzimático de amidos gera resíduo praticamente nulo, pois são utilizadas quantidades mínimas de enzima em comparação com o substrato gerado. Além disso, por serem altamente específicas, as enzimas causam mudanças singulares nos amidos. Essas modificações podem ser desde pequenas quebras na cadeia, até a formação de monômeros de glucose (SEVERO et al., 2010).

3.3.1.1 Enzimas utilizadas

As principais enzimas utilizadas para modificações são as amilases e glucoamilases, com a presença, em alguns casos, de proteases (substratos mais complexos) (SEVERO et al., 2010).

As amilases (1,4- α -D-glucan glucanohidrolase) hidrolisam as ligações α 1-4 apenas, sendo que têm ações distintas, dependendo do tipo de enzima. As α -amilases são consideradas endoenzimas, agindo de dentro para fora da molécula, e têm como produto final a maltose. Atuam em pH próximo da neutralidade (5,5 a 7,0) e possuem relativa estabilidade térmica (60 °C), sendo usadas principalmente na produção de cerveja (BENASSI et al., 2010; SEVERO et al., 2010). As β -amilases agem de forma semelhante, porém são exoenzimas, ou seja, agem de fora para dentro, nas pontas de terminais não redutores e tem como produto final dímeros de glicose (BENASSI et al., 2010).

As glucoamilases (1,4- α -D-glucan hidrolase) são enzimas hidrolíticas, capazes de formar monômeros de glucose a partir de cadeias poliméricas de amido, mais especificamente nas pontas destas. Usadas em associação com as amilases (que fornecem fragmentos de dextrinas menores), possuem menor estabilidade térmica, sendo utilizadas depois do processo de mosturação nas cervejarias (BENASSI et al., 2010).

3.3.2Aplicação da modificação no resíduo da extração de amido

Devido à semelhança existente entre o bagaço de pinhão e o amido extraído, é possível aplicar muitas das técnicas de modificações e buscar aplicações semelhantes às dadas ao amido. Segundo Spada et al. (2012a) o amido possui alta capacidade de microencapsulação de β -caroteno e boa estabilidade nas condições estudadas.

O amido de pinhão modificado com ácido também foi utilizado em estudo semelhante, apresentando alto teor de β -caroteno retido na estrutura, demonstrando a importância da modificação nas propriedades do amido (SPADA et al., 2012b). Também é encontrado na literatura (LUCHESE et al, 2015) a utilização de amido de pinhão nativo e ácido-modificado para produção de biofilmes. Segundo Daudt et al, (2013) o amido de pinhão pode ser utilizado como excipiente na indústria farmacêutica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da amostra

O pinhão foi adquirido no mercado local de Ponta Grossa entre abril e julho de 2015. Para a retirada da casca utilizou-se uma faca doméstica. Para obtenção da farinha foi usado um triturador de bancada (Ika Werke M20 - Wilmington, North Carolina, USA). Amido, fibras e outros constituintes foram separados pelo processo de decantação usando água, sob refrigeração. A separação do amido e do bagaço foi executada usando peneira de 180 mesh, com o auxílio de uma bomba de vácuo. As frações foram acondicionadas em estufa com circulação de ar a 40 °C até estabilização da umidade, entre 10 e 15%. As amostras foram armazenadas em dessecador.

4.2 Tratamento enzimático

A partir da amostra de bagaço de pinhão foi realizado o tratamento enzimático. O complexo enzimático utilizado foi Distillase ® SSF, da empresa Genencor ® (Marca registrada da empresa Danisco US Inc.), composto por: α -Amilase [1,4- α -D-glucanglucanohidrolase]; Glucoamilase [1,4- α -D-glucan hidrolase] Protease [Aspergillopepsina].

Para a modificação enzimática, as condições do meio onde o bagaço foi disperso foram padronizadas de acordo com as recomendações do fabricante, no caso: temperatura entre 28 e 35 °C (utilizou-se temperatura de 32 $\pm$ 1°C) e pH entre 4,0 e 5,5 (pH de 5,0 $\pm$ 0,5 selecionado, utilizando tampão acetato) além de concentração enzimática de 0,07g/100g.

Durante a modificação do bagaço de pinhão, a dispersão água/bagaço/enzima foi agitada e mantida na temperatura adequada. Os tempos de ação enzimática foram de 12h, 24h e 36h.

Após esse tempo, a dispersão foi lavada com água suficiente para interrupção da atividade enzimática (por diluição) e posteriormente filtrada e acondicionada em estufa de secagem com circulação de ar a 40°C para posterior armazenamento em dessecador, com identificação das amostras com as siglas B, C e D, referentes aos

tratamentos 12, 24 e 36 horas, respectivamente. O bagaço nativo de pinhão foi identificado com a sigla A.

4.3 Composição centesimal

As análises de composição centesimal foram realizadas nas amostras de bagaço nativo e tratadas enzimaticamente, depois de secagem. Foi realizada a determinação de proteínas, lipídios, cinzas e conteúdo de fibra através de protocolos 960.52, 920.39C, 923.03 e 962.09E, respectivamente (AOAC, 1990). A quantificação de umidade foi realizada através de um determinador de umidade modelo MA150 (Sartorius), nas condições: temperatura de 105 °C; tempo de 15 minutos e massa de amostra de 0,500g (CAFIERI et al, 2010).

4.4 Análises térmicas

Neste trabalho foram utilizadas três técnicas termoanalíticas para caracterização do amido: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). Equipamento para suporte e pesagens: balança analítica para pesagem das amostras (ADA 210/C Adam Equipment CO. LTD, especificações pesagem máxima 210g, mínima pesagem de 0,1 mg).

4.4.1 Termogravimetria (TG) e Análise térmica diferencial (DTA)

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas com o equipamento TGA-60 (*Shimadzu, Japão*), onde as amostras foram aquecidas de 35°C até 600°C, usando cadinho de alumina aberto com aproximadamente 6,0 mg de amostra sob um fluxo de ar com vazão de 150 mL.min⁻¹ e uma razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. O instrumento foi preliminarmente calibrado com oxalato de cálcio mono-hidratado. Todas as percentagens de perda de massa foram determinadas utilizando o programa de análise de dados TA-60 WS. A Análise térmica diferencial (DTA) foi determinada com o auxílio do mesmo equipamento para obtenção das temperaturas de perda de massa e dos picos característicos.

4.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA) foi utilizado para obtenção dos resultados DSC.

A amostra foi hidratada por 30 minutos antes da análise, em proporção 1:4 em tubo de ensaio. Posteriormente, utilizando uma micropipeta de 20 μL foi adicionada a suspensão em cadinho de alumínio, que teve a massa aferida e foi selado. Com isso, $\frac{1}{4}$ da massa aferida na balança se referiu à massa de amido da amostra. Este valor foi utilizado no programa do equipamento. As condições para obtenção da curva: fluxo de ar $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento $10 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura final de $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5 Análise reológica (RVA)

O equipamento Rápido Visco-analisador (Newport Scientific) foi utilizado para obtenção do perfil reológico da amostra.

As suspensões de amido foram preparadas com a adição de 8% (aproximadamente 2,24g) de amido em água destilada em um recipiente de alumínio com massa total de 28 gramas (COSTA et al, 2013). O processo controlado de aquecimento e resfriamento ocorreu sob constante agitação. A programação do sistema foi: 50°C com isoterma por minutos, então $6 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$; isoterma de $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, resfriamento até 50°C a uma taxa de $6 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e isoterma de 50°C por 2 minutos.

4.6 Análises estruturais

4.6.1 Difractometria de raios X (XRD)

O equipamento utilizado para obtenção do grau de cristalinidade relativa das amostras foi um difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku, Japão), pelo método pó, usando como fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,541 \text{ \AA}$. Os parâmetros elétricos ajustados em 40 kV e 20 mA. A detecção foi realizada no intervalo angular entre 5 e 50 graus (2θ), com velocidade de leitura de 2 graus por minuto e passo de 0,02 graus.

O grau de cristalinidade relativa foi estimado utilizando o método descrito por Colman et al (2014). Um exemplo de gráfico gerado pelo equipamento está representado na Figura 5.

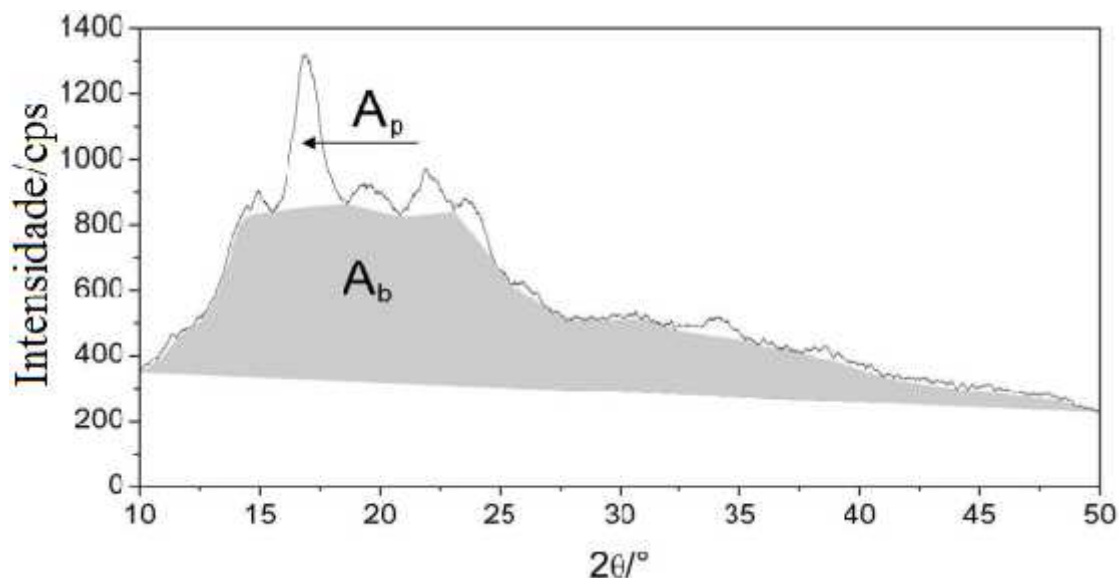


Figura 4. Difratograma e parâmetros para cálculos de cristalinidade

Fonte: COLMAN et al, 2014.

Na Figura 4 foram considerados A_p (área de pico) como parcela cristalina e A_b (área parcela amorfa) como parcela amorfa. Foi realizada a integração das áreas do pico de difração superior e total de difração para que se pudesse obter o grau de cristalinidade relativa, como mostrado na Equação 1:

$$X_c = \frac{A_p}{(A_p + A_b)} \cdot 100 \quad (1)$$

X_c se refere a cristalinidade relativa.

4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia eletrônica de varredura foi realizada no equipamento VEGA3 do fabricante TESCAN (República Tcheca). A escala de leitura foi 20 μm , com 20 kV de tensão no feixe de elétrons, filamento de tungstênio e detector de elétrons retro-espeelhado.

O equipamento se baseia na passagem de elétrons através da amostra. Para o preparo desta é afixado uma fita de carbono sobre um suporte metálico, que recebe uma pequena fração da amostra. Como o amido não é condutor, é realizado previamente o processo de metalização com plasma de ouro e paládio.

A leitura da imagem acontece a partir do detector de elétrons, que registra as imagens e as transmite a um software instalado no computador acoplado ao equipamento. O diâmetro médio das amostras (D_a) é obtido com o auxílio de uma ferramenta do programa do equipamento, sendo realizadas seis medidas dos grânulos presentes na imagem.

4.6.3 Análise estatística

As análises descritas foram realizadas em triplicata, sendo aplicado: Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com o intuito de comparar as médias apresentadas com 95% de confiança, utilizando o programa SASM-Agri 8.2 (Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal

Os resultados da análise centesimal das amostras de bagaço estão mostrados na Tabela 2. Como pode ser visto, os carboidratos estão em quantidades elevadas, como é evidenciado por alguns autores (CORDENUNSI et al, 2004).

Mesmo depois da extração, a maioria dos carboidratos está na forma de amido, dispostos entre as fibras. Além disso, as proporções de fibras e proteínas apresentaram altos teores, mas inferiores quando comparados aos valores obtidos por alguns autores (CORDENUNSI et al, 2004; COSTA et al, 2013; HENRIQUEZ et al, 2013).

Tabela 2. Composição centesimal das amostras nativa e modificadas.

Amostra	Composição centesimal (g/100g)					
	Umidade	Carboidratos	Proteína	Lipídios	Fibra total	Cinzas
(A)	13,87±0,27 ^a	83,63±0,55 ^b	0,44±0,02	0,75±0,06	1,07±0,29	0,24±0,02 ^{ab}
(B)	9,60±0,04 ^b	86,83±0,62 ^a	0,44±0,01	0,80±0,03	2,12±0,64	0,21±0,01 ^b
(C)	9,12±0,04 ^c	87,90±0,41 ^a	0,43±0,01	0,76±0,02	1,52±0,44	0,27±0,02 ^a
(D)	8,97±0,24 ^c	88,08±0,28 ^a	0,43±0,02	0,74±0,02	1,53±0,47	0,25±0,02 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

(A) bagaço de pinhão nativo; (B) bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por 12 h; (C) bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por 24 h; (D) bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por 36 h

As diferenças observadas entre os valores obtidos para a amostra nativa e as tratadas enzimaticamente indicam diminuição da umidade e aumento dos carboidratos. Como foi utilizado um complexo enzimático contendo amilases, esperava-se uma diminuição no teor de carboidratos, uma vez que o amido sujeito a hidrólise gera unidades menores, que não são retidas no filtro e também podem ser solubilizadas em água (MAYER et al, 2015). Contudo, a ação da enzima promoveu um aumento da quantidade de carboidratos, o que pode ter relação com a adição de uma molécula de água (18g.mol^{-1}) durante a hidrólise e a retenção desses compostos na estrutura do bagaço.

Os baixos níveis de gordura e cinzas também estão de acordo com estudos (PANDEY et al, 2000) com bagaço de mandioca.

5.2 Termogravimetria e Análise térmica diferencial (TG-DTA)

As curvas TG-DTA mostradas na Figura 5 indicam similaridade entre as 4 amostras (bagaço nativo e modificado), com 3 perdas de massa e uma zona de estabilidade, assim como em outros estudos com: amido de pinhão (COSTA et al, 2013), arroz (COLUSSI et al 2014), *M. jalapa* (PUMACAHUA-RAMOS et al, 2015), *F. ussuriensis* (LI et al, 2000), mandioca (BENINCA et al, 2013), milho (OLIVEIRA et al, 2014) e gengibre amarelo (ZHANG et al, 2009).

A primeira perda de massa está relacionada com a perda de umidade das amostras, mostrado pelas curvas DTA por um processo endotérmico, que ocorre entre 30 a 146°C (Tabela 3). Depois da zona de estabilidade (136 a 218°), foi observado perdas de massa relacionadas com a degradação térmica da amostra e com a decomposição da matéria orgânica, restando apenas cinzas, com valores para as amostras: A: 0,47%; B: 0,36%; C: 0,33% e D: 0,35%. Esses valores estão próximos aos obtidos pela análise centesimal (Tab.2), considerando o erro instrumental e diferença de precisão entre os métodos 2.

Pode ser constatado que nas amostras (A) e (C), depois que a temperatura foi elevada, apresentou uma deformação assimétrica, chamada de “ombro” durante o intervalo de temperatura da segunda perda (~330, 340°C), indicado na Fig. 5 pela letra ‘O’. Esse fenômeno indica que a degradação dessas amostras é muito complexa e que possivelmente é composta por sub-estágios de degradação (JANKOVIĆ et al, 2013).

Tabela 3. Resultados de TG e DTA das amostras: (A) bagaço não-tratado de Pinhão e bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por (B) 12 h, (C) 24h e (D) 36h.

Amostras	Resultado TG e DTA			
	Etapa	Dm/%	DT/°C	T _p /°C
(A)	1 ^a	11,38	30-136	67,52 (endo)
	estabilidade	-	136-208	-
	2 ^a	71,60	208-401	274,48 (exo)
				324,62 (exo)
				340,10 (ombro)
	3 ^a	16,55	401-565	492,29 (exo)
(B)	1 ^a	8,23	30-142	72,98 (endo)
	estabilidade	-	142-216	-
	2 ^a	73,36	216-401	272,82 (exo)
				340,43 (exo)
	3 ^a	18,05	401-566	497,15 (exo)
(C)	1 ^a	10,82	30-137	75,53 (endo)
	estabilidade	-	137-211	-
	2 ^a	71,77	211-403	274,29 (exo)
				322,72 (exo)
				329,82 (ombro)
	3 ^a	17,08	403-569	493,29 (exo)
(D)	1 ^a	9,70	30-150	68,24 (endo)
	estabilidade	-	150-218	-
	2 ^a	71,97	218-400	274,31 (exo)
				338,95 (exo)
	3 ^a	17,99	400-560	495,40 (exo)

Δm, perda de massa (%); ΔT, intervalo de temperatura (°C); T_p, Temperatura de pico (°C).Endo:endotérmico; Exo: Exotérmico

(A) bagaço de pinhão nativo; (B) bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por 12 h; (C) bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por 24 h; (D) bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por 36 h

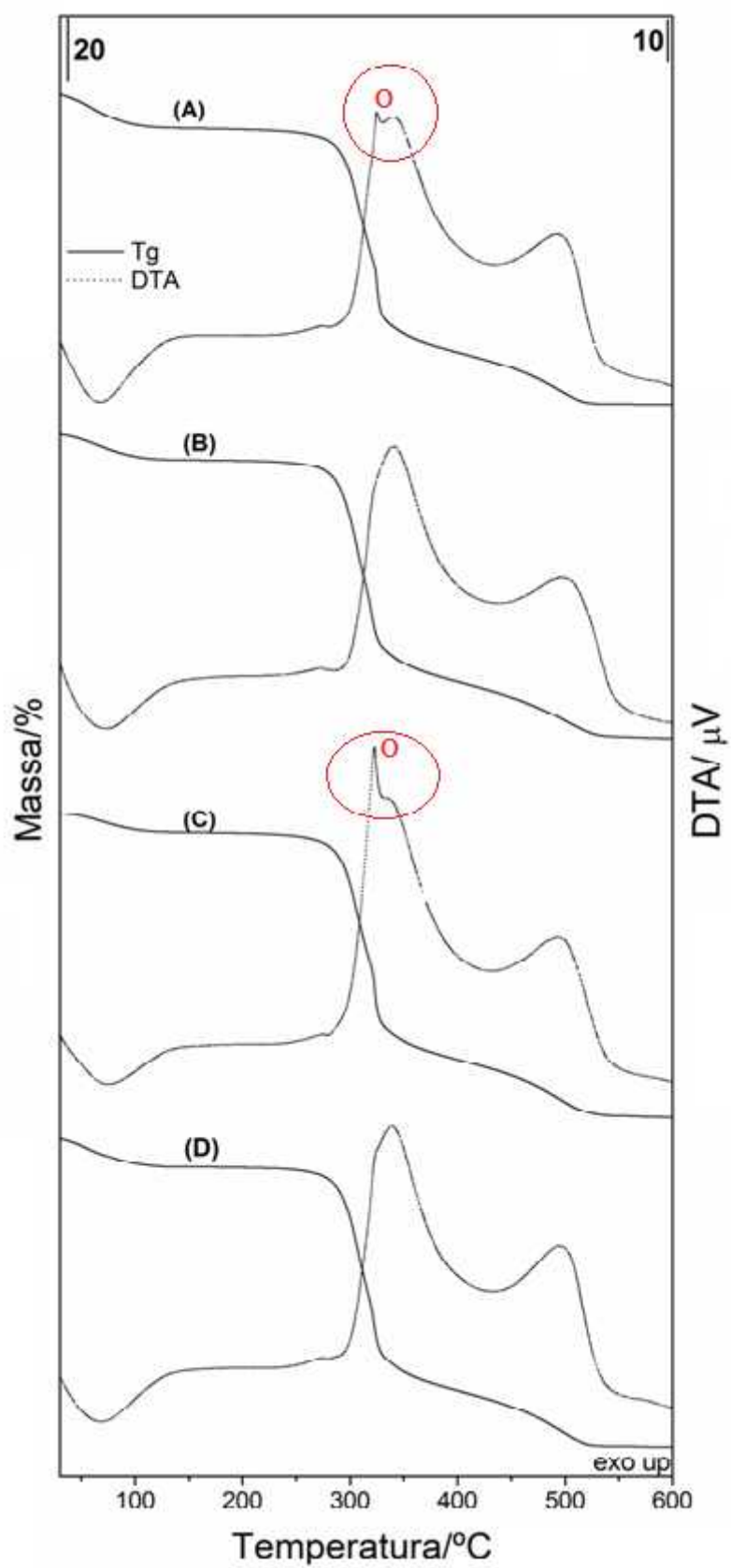


Figura 5. Curvas TG-DTA das amostras de bagaço nativo e tratadas

5.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os resultados da análise DSC estão mostrados na Tabela 4. As amostras mostraram diferenças estatísticas para a maioria dos parâmetros. Os valores de T_o aumentaram para todos os tratamentos enzimáticos, com o maior valor para a amostra B. Os valores de T_p e T_c tiveram um pequeno aumento para a amostra B e então decaíram para as amostras C e D.

O fato descrito tem relação com as mudanças estruturais que o bagaço de pinhão sofre durante o tratamento enzimático. Essas mudanças estruturais aproximam as amostras de bagaço modificadas ao amido de pinhão nativo, como descrito na literatura (RIBEIRO et al, 2014), onde foi encontrado, para a amostra nativa de pinhão, valor de T_c muito similar ao obtido nesse estudo ($71,63 \pm 6,06^\circ\text{C}$). Alguns autores (BELLO-PÉREZ et al, 2006) também encontraram valores similares para ΔH_{gel} ($8,0 \pm 0,5 \text{ J.g}^{-1}$) analisando amostras de pinhão nativo do estado de São Paulo - Brasil.

Tabela 4. Resultados das análises DSC, MEV e XRD de: (A) bagaço não-tratado de Pinhão e bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por (B) 12 h, (C) 24h e (D) 36h.

Amostra	DSC gelatinização				XRD	MEV
	$T_o/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H_{\text{gel}}/\text{J.g}^{-1}$	Grau de cristalinidade relativa	d_a
(A)	$60,57 \pm 0,01^d$	$66,38 \pm 0,01^c$	$71,62 \pm 0,07^b$	$8,85 \pm 0,07^a$	$17,76 \pm 0,30^a$	$11,10 \pm 3,55^a$
(B)	$61,50 \pm 0,02^a$	$67,58 \pm 0,01^a$	$73,41 \pm 0,26^a$	$8,54 \pm 0,25^{ab}$	$16,82 \pm 0,30^b$	$13,39 \pm 3,09^a$
(C)	$61,35 \pm 0,01^b$	$66,42 \pm 0,01^b$	$68,14 \pm 0,01^c$	$8,00 \pm 0,06^b$	$16,17 \pm 0,30^b$	$12,54 \pm 2,25^a$
(D)	$60,99 \pm 0,01^c$	$65,88 \pm 0,01^d$	$68,04 \pm 0,01^c$	$8,45 \pm 0,35^{ab}$	$14,26 \pm 0,26^c$	$12,54 \pm 3,61^a$

(*) T_o temperatura 'onset' inicial, T_p temperatura de pico, T_c "endset" temperatura de conclusão, ΔH_{gel} entalpia de gelatinização, (d_a) Diâmetro médio. O grau de cristalinidade relativa foi calculado como porcentagem, com picos determinados em 2θ . Valores seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A Figura 6 mostra as curvas DSC obtidas para as amostras de bagaço, tanto nativas quanto modificadas. Eles se mostraram muito similares, com o pico endotérmico característico, que representa o processo de gelatinização. Os valores de ΔH_{gel} , que representam a área total do pico endotérmico apresentaram pequenas

diferenças. As principais mudanças foram observadas nos parâmetros de temperaturas, que podem ser verificados pela mudança na posição dos picos. O início do processo de gelatinização ocorreu em temperatura mais alta (acompanhando o aumento no valor de T_0) e o final em temperatura mais baixa (com os valores de T_c diminuindo). Tais resultados são encontrados na literatura (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998), quando os autores analisaram amostras nativas e parcialmente hidrolisadas de amidos de milho, trigo, arroz e batata. No estudo citado, os valores de T_0 também aumentaram para todas as amostras.

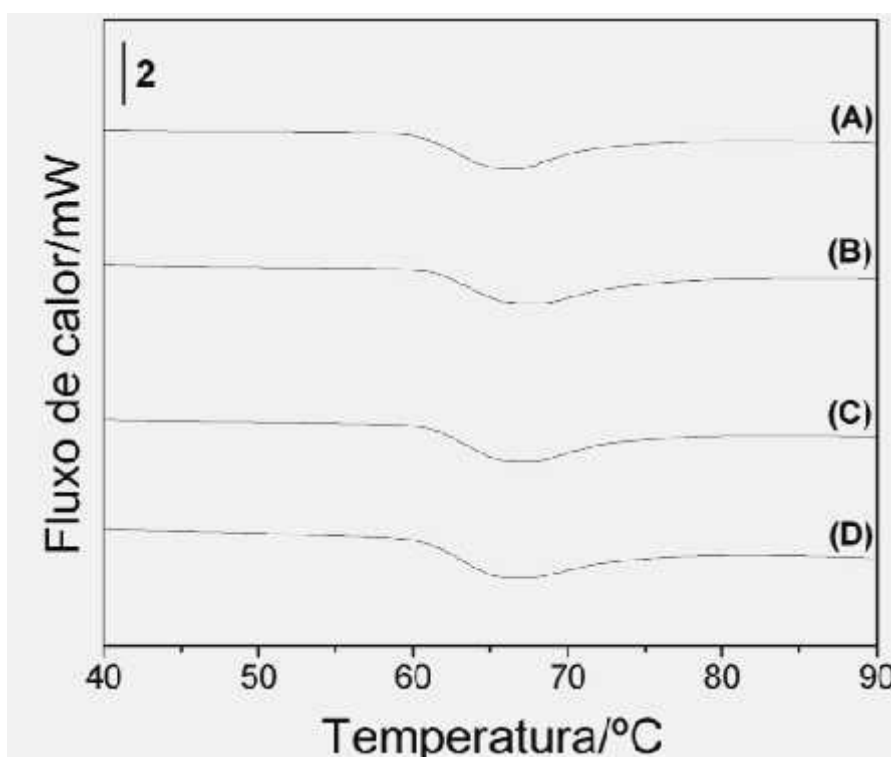


Figura 6. Curvas DSC das amostras de bagaço nativo e tratadas.

Foi reportado em alguns estudos (ZHAO et al, 2015) que o processo de inchamento dos grânulos (concomitante ao processo de gelatinização) ocorre em temperaturas mais baixas para grânulos de amido maiores. Esse fato possivelmente explica o que ocorreu com alguns dos parâmetros do bagaço de pinhão tratado enzimaticamente, uma vez que depois da modificação, a amilase e a glucoamilase tendem a quebrar a estrutura dos grânulos, fazendo-os menores. O complexo enzimático deveria agir mais intensamente no amido presente no bagaço, mas na concentração que foi usado apenas diminuiu o tamanho dos grânulos e promoveu a mudança estrutural no bagaço.

5.4 Análise reológica (RVA)

Na Figura 7 estão apresentadas as curvas obtidas após a análise reológica. Pode ser observado que as amostras apresentam diferentes perfis, com valores de viscosidade de pico e retrogradação maiores para as amostras tratadas enzimaticamente. Considerando que o tratamento enzimático diminui o tamanho dos grânulos, era esperado que a viscosidade de pico e a retrogradação tivessem valores menores (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998).

Contudo, observou-se nos resultados do DSC (Tabela 4) e nas micro-imagens do MEV (Figura 9) que o tratamento enzimático promoveu uma mudança estrutural, que fez com que as amostras B,C e D ficassem semelhantes ao amido de pinhão. Os perfis reológicos obtidos depois do tratamento foram similares aos encontrados na literatura (COSTA et al, 2013; RIBEIRO et al, 2014).

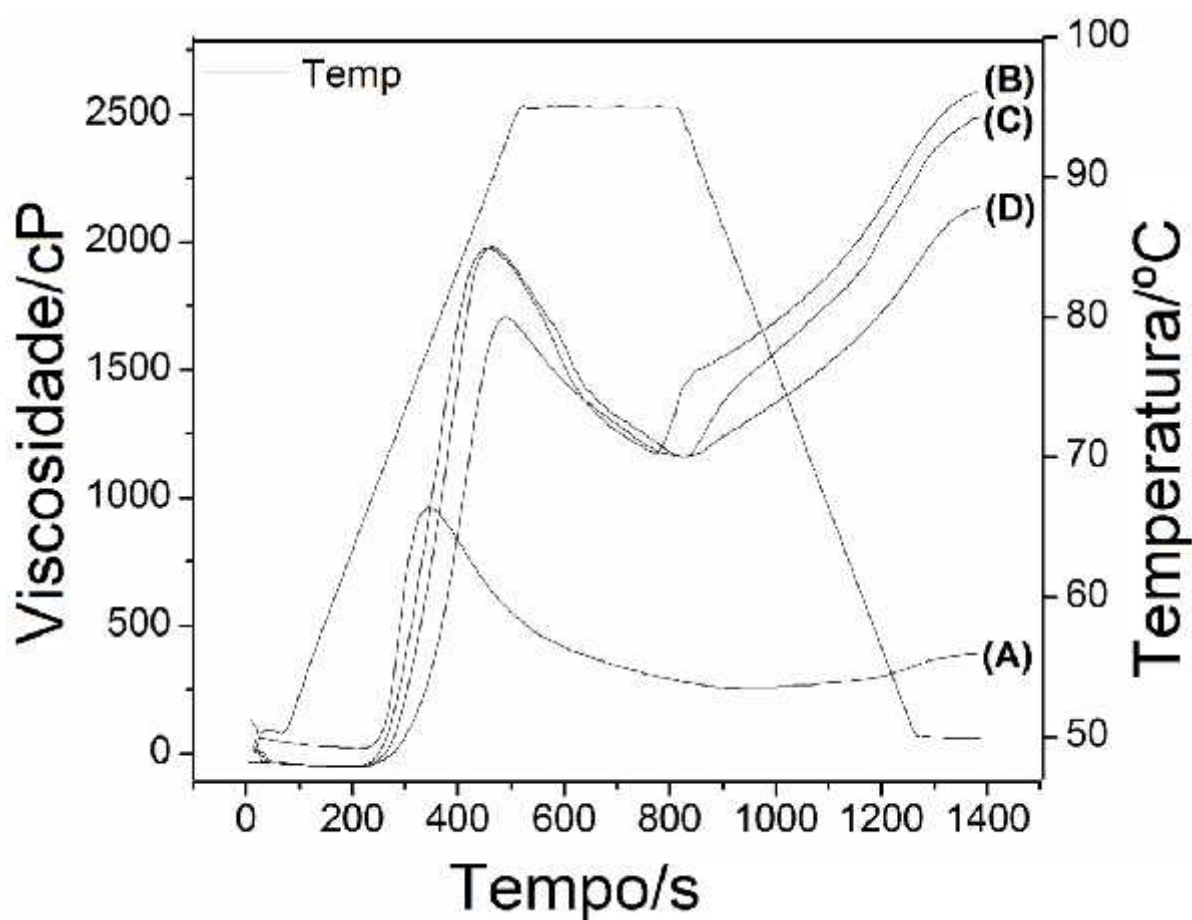


Figura 7. Perfis RVA das amostras de bagaço nativo e tratadas.

Tabela 5. Resultados do RVA para as amostras: (A) bagaço não-tratado de pinhão e bagaço de pinhão tratado enzimaticamente por (B) 12 h, (C) 24h e (D) 36h.

Amostra	Temperatura de Pasta /°C	Viscosidade do pico /cP	Tempo do pico /seg	Setback/cP	Breakdown/cP	Viscosidade Final/cP
(A)	66,73±0,39 ^b	960,30±0,99 ^c	343,90±0,14 ^d	134,10±1,27 ^d	704,90±1,56 ^c	389,50±0,71 ^d
(B)	70,55±0,78 ^b	1994,30±0,99 ^a	451,90±0,14 ^c	1450,00±2,83 ^a	839,00±1,41 ^a	2603,50±2,12 ^a
(C)	70,18±0,11 ^b	1992,20±1,70 ^a	455,50±0,71 ^d	1334,25±1,06 ^b	828,20±1,70 ^b	2498,25±1,06 ^b
(D)	73,50±0,07 ^a	1740,50±0,71 ^b	480,03±0,04 ^a	988,75±0,35 ^c	570,50±0,71 ^d	2158,75±0,35 ^c

^(*)cP “centipoises”, seg “segundos”. Valores seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

A Tabela 5 apresenta os resultados dos perfis reológicos. Os valores diferiram estatisticamente, e a temperatura de pasta apresentou diferenças entre as três primeiras amostras (A, B e C) e a última (D). Os valores da viscosidade de pico aumentaram para as amostras B e C, e diminuíram para a amostra D. A amostra nativa de bagaço de pinhão apresentou baixa viscosidade de pico e final, que tem relação direta com as fibras e proteínas presentes na amostra. Isso causou a instabilidade dos géis formados, e o amido presente entre as fibras tem baixa viscosidade depois do processo de gelatinização.

É descrito na literatura (COSTA et al, 2013; RIBEIRO et al, 2014) valores entre 2280 e 3383cP para viscosidade de pico do amido de pinhão nativo de uma fonte de germoplasma (Colombo-PR) e a região de Ponta Grossa. As amostras tratadas enzimaticamente B, C e D apresentaram aumento na viscosidade de pico, mas ainda longe desses estudos. Isso pode ser explicado pelo fato de que o amido que está entre as fibras não pode gelatinizar completamente, uma vez que estão envoltos por fibras e proteínas. O tratamento enzimático, conforme constatado pelas análises promoveu uma mudança estrutural no amido, porém os macro-componentes ainda estão presentes.

5.5 Difração de Raios-X (XRD)

A Figura 8 mostra os difratogramas de raios-X das amostras de bagaço nativo e tratados enzimaticamente. Os ângulos dos picos principais das amostras

analisadas foram: (A) 15,12°, 17,3°, 21,68° e 23,14°; (B) 15,28°, 17,46°, 20,66° e 23,64°; (C) 15,26°, 16,94°, 22,16° e 23,22° e (D) 15,24°, 17,38°, 22,10° e 23,50°.

Os difratogramas de Raios-X dos amidos são principalmente de três tipos (DAUDT et al, 2013). O tipo “A” tem os picos principais de refração 2θ em 15°, 17°, 18° e 23° e pode ser encontrado principalmente em amidos de cereais, como milho, arroz e trigo. Para os do tipo “B” os picos são em: 5°, 6°, 15°, 17°, 22° e 23° e pode ser encontrado em amidos de tuberosas, como batata e inhame. Os picos do tipo “C” são uma mistura dos tipos “A” e “B” e o exemplo típico é o amido de mandioca.

Analisando os difratogramas das amostras de bagaço de pinhão nativo e modificadas, os ângulos principais dos picos não mudaram consideravelmente, uma vez que os padrões obtidos estão muito próximos ao nativo, que é semelhante ao tipo “A” para amidos. Esse padrão é encontrado na literatura (DAUDT et al, 2013; THYS et al, 2010; GONÇALVES et al, 2014, RIBEIRO et al, 2014) para amido de pinhão nativo.

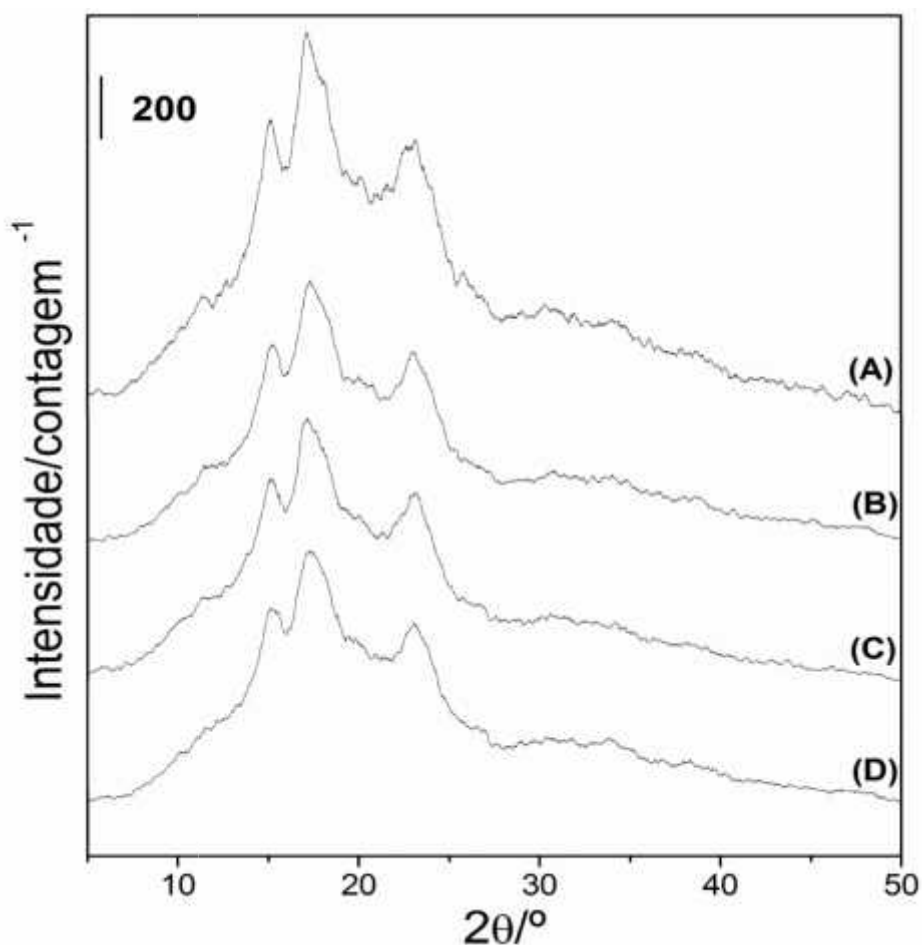


Figura 8. Difratogramas XRD das amostras de bagaço nativo e tratadas

Os valores das amostras para o grau relativo de cristalinidade estão mostrados na Tabela 4. Eles diminuíram depois do tratamento enzimático para todas as amostras. Na literatura (COSTA et al, 2013; RIBEIRO et al, 2014) são encontrados valores que começam em $19,03 \pm 0,06\%$ e vão até $28,43 \pm 0,11\%$.

Considerando os valores citados e os obtidos nesse estudo, existe uma grande diferença entre eles, com os menores valores para o bagaço de pinhão. Isso pode ser explicado pela posição do amido na amostra; quando ele está isolado, como encontrado na literatura, o valor do grau relativo de cristalinidade é maior porque a amilose e a amilopectina estão mais caracterizáveis pela análise de difração de Raios-X; no bagaço de pinhão o amido está entre as fibras e esse fato parece diminuir a cristalinidade (BLAZEK; GILBERT, 2011).

5.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micro-imagens de MEV estão mostradas na Figura 9. Pode ser observada, principalmente na amostra de bagaço nativo (A), a presença de diferentes compostos, como fibra, proteína e grânulos de amido. Esse fato é explicado pela análise centesimal previamente realizada (Tabela 2) que mostra a presença desses componentes.

Mesmo que a composição centesimal seja bastante similar a muitos estudos com amido de pinhão (CORDENUNSI et al, 2004; COSTA et al, 2013; HENRÍQUEZ et al, 2008), no bagaço de pinhão o amido está entre as fibras e as proteínas. É descrito o mesmo comportamento para bagaço de mandioca (VERSINO et al, 2015) com conteúdo de amido maior que 50% em base seca, mas também presente entre as fibras.

Os grânulos de amido têm diferentes tamanhos e formas dependendo da fonte botânica (SRICHUWONG et al, 2005). Eles têm tamanhos variados e na maioria estão no intervalo de 1 a $110\mu\text{m}$ (SINGH et al, 2003). Os grânulos das amostras B, C e D estão claramente mais isolados e mostram várias formas, predominantemente oval. Imagens semelhantes foram obtidas por alguns autores (DAUDT et al, 2014; GOLÇALVES et al, 2014; BELLO-PÉREZ et al, 2006, HENRÍQUEZ et al, 2008) analisando amido de pinhão nativo. Não houve diferença estatística entre os tamanhos dos grânulos das amostras (Tab.4) e as suas médias

estão de acordo com a literatura (COSTA et al, 2013; GONÇALVES et al, 2014; RIBEIRO et al, 2014; BELLO-PÉREZ et al, 2006; HENRÍQUEZ et al, 2008).

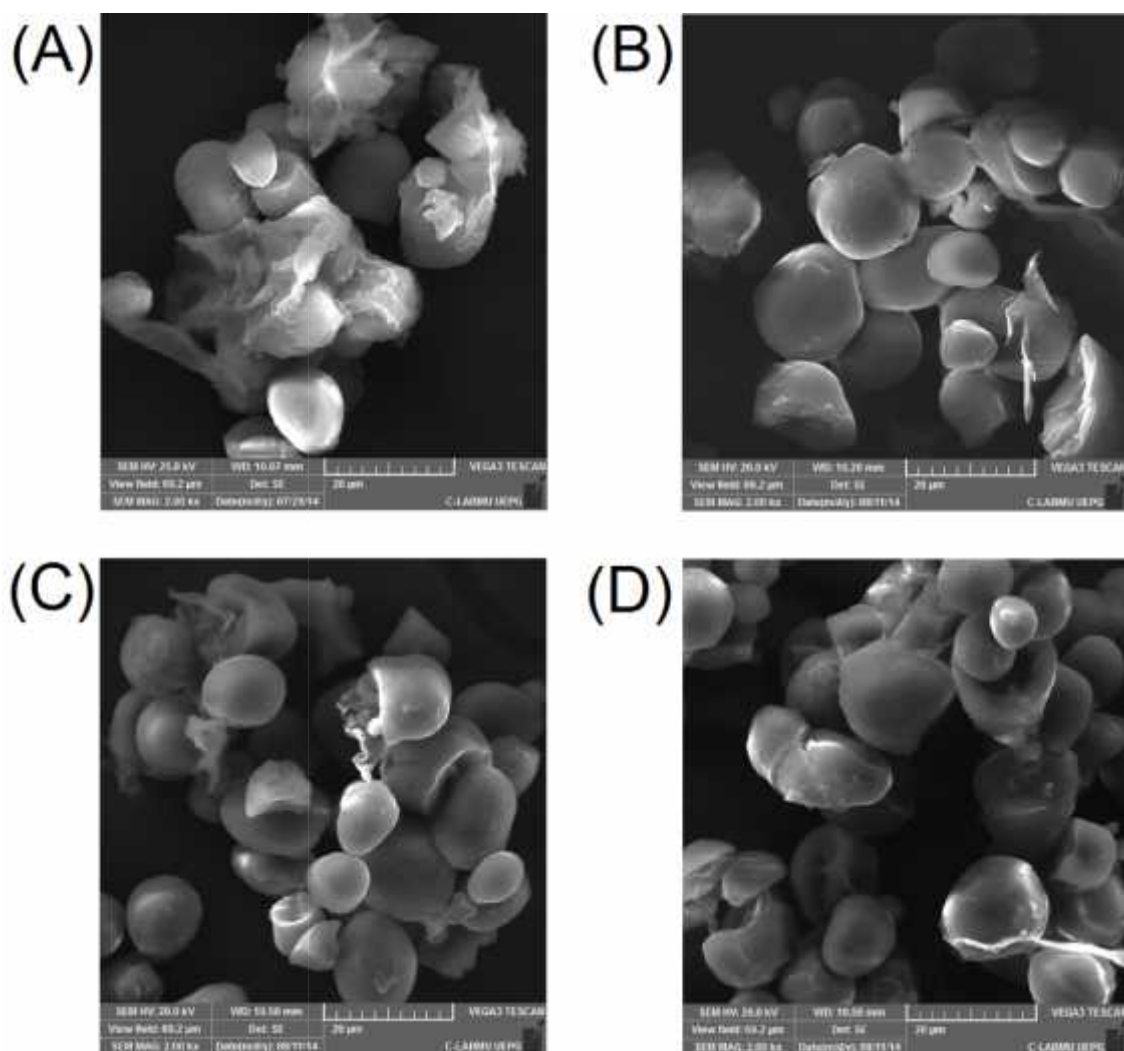


Figura 9. Micro-imagens de MEV das amostras de bagaço nativo e tratadas

6. CONCLUSÕES

Os carboidratos amiláceos são os componentes majoritários do bagaço de pinhão. As amostras nativa (A) e modificadas (B, C e D) apresentaram composições semelhantes, ocorrendo uma reorganização na estrutura do bagaço.

Através do TG-DTA foi possível observar a presença de uma deformação assimétrica (ombro) nas amostras A e C, em virtude de uma degradação térmica consecutiva, com sub-estágios. Pelo DSC foi observado um aumento na T_o e uma diminuição na temperatura de pico (T_p), temperatura de conclusão (T_c) e entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}) para as amostras modificadas enzimaticamente.

Foram observados nas curvas do RVA, diferentes perfis para cada amostra. As amostras modificadas apresentaram viscosidade de pico e retrogradação mais elevadas.

Os difratogramas de Raios-X das amostras de bagaço de pinhão mostraram grande semelhança com o padrão do tipo “A” de amidos. Houve pequenas diferenças entre os valores do grau de cristalinidade relativa entre as amostras de bagaço. Além disso, os valores são menores quando comparados com a literatura, considerando a complexidade da matriz do bagaço.

O MEV permitiu identificar diferentes compostos, como fibras e proteínas na estrutura do grânulo do bagaço. Depois da modificação enzimática, esses compostos foram ligeiramente isolados dos grânulos e não houve diferença estatística significativa entre os tamanhos encontrados para os grânulos.

Os resultados permitiram determinar novas propriedades reológicas para o bagaço de pinhão tratado enzimaticamente, além de um isolamento nos grânulos de amido presentes, o que abre possibilidades de aplicação desse subproduto. Indica também um possível aumento de rendimento em posteriores extrações de amido desta matéria-prima.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch, **Thermochimica Acta**, v. 319 , p. 17-25, 1998.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Virginia, USA, 1990.

BELLO-PÉREZ, L. A.; GARCÍA-SUÁREZ, F. J.; MÉNDEZ-MONTEALVO, G.; DO NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Isolation and Characterization of Starch from Seeds of *Araucaria brasiliensis*: A Novel Starch for Application in Food Industry. **Starch/Stärke** v.58, p. 283–291, fev. 2006.

BENASSI, V. M.; LUCAS, R.C.; MICHELIN, M.; JORGE, J. A.; TERENCEZ H. F.; POLIZELI M. L. T. M.. Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 253-260, set. 2012.

BENINCA, C.; COLMAN, T.A.D.; LACERDA, L.G.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; BANNACH, G.; SCHNITZLER, E. The thermal, rheological and structural properties of cassava starch granules modified with hydrochloric acid at different temperatures, **Thermochimica Acta**, v. 552, p. 65-69, 2013.

BICUDO S. C. W; DEMIATE, I. M; BANNACH, G.; LACERDA, L. G; FILHO, M. A. S. C.; IONASHIRO, M.; SCHNITZLER, E. Thermoanalytical study and characterization of native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O. Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mill). **Eclética Química**, v. 34, n. 1, pp. 7-12, jul. 2009.

BLAZEK, J.; GILBERT, E.P. Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review, **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 281-293, 2011.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.; **Química do Processamento de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela,. 1992. 151p.

CAFIERI, S.; MASTROMATTEO, M.; CHILLO, S.; DEL NOBILE, M. A. Modeling the mechanical properties of pasta cooked at different times. **Journal of food engineering**. v. 100, p. 336-342, 2010.

CAMARGO K. F.; LEONEL M.; MISCHAN M. M. Produção de biscoitos extrusados de polvilho azedo com fibras: efeito de parâmetros operacionais sobre as propriedades físicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 586-591, set. 2008.

CASTAÑO, J.; BOUZA, R.; RODRIGUEZ-LLAMAZARES, S.; CARRASCO, C.; VINICIUS, R.V.B. Processing and characterization of starch-based materials from pehuen seeds (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch). **Carbohydrate Polymers**, v.88, p. 299-307, dez. 2012.

CLADERA-OLIVERA, F.; PETTERMANN, A. C.; NOREÑA, C. P. Z.; WADA, K.; MARCZAK, L. D. F.. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 900–907, dez. 2006.

CLERICI, M. T. P. S.; EL-DASH, A. A.. Características tecnológicas de farinhas de arroz pré-gelatinizadas obtidas por extrusão termoplástica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, out. 2008.

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, p. 2245-2252, 2014.

COLUSSI, R.; PINTO, V.Z.; EL HALAL, S.L.M.; VANIER, N.L.; VILLANOVA, F.A.; SILVA, R.M.; ZAVAREZE, E.R.; DIAS, A.R.G. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches, **Carbohydrate Polymers** v.103, p. 405-413, 2014.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Comparative Study of the Starch Digestibility of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* Seed Flour. **Starch/Stärke**, v.60, p. 192–198, jan. 2008.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Starch Characterisation of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* Seeds. **Starch/Stärke** v.59, p. 284–289, mar. 2007.

CONTO, L. C.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; STEEL, C. J.; CHANG, Y. K. Physico-chemical., morphological., and pasting properties of Pine nut (*Araucaria angustifolia*) starch oxidized with different levels of sodium hypochlorite. **Starch/Stärke**, v. 63, p. 198–208, dez. 2011.

CORDENUNSI, B. R.; DE MENEZES E. W.; GENOVESE, M. I.; COLLI, C.; DE SOUZA, A. G. A.; LAJOLO, F. M. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p. 3412-3416, mar. 2004.

COSTA, F. J. O. G.; LEIVAS, C. L.; WASZCZYNSKYJ, N.; DE GODOI, R. C. B.; HELM, C. V.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 172–177, mai. 2013.

DAUDT, R. M.; KULKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVERA, F.; THYS R. C. S.; MARCZAK, L. D. F. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v.52, p. 420–429, out. 2013.

DENARDIN C. C.; SILVA L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v.39, n.3, jun. 2009.

FRANCO, C. M. L.; OGAWA, C.; RABACHINI, T.; ROCHA, T. S.; CEREDA, M. P.; JANE, J. Effect of lactic acid and UV irradiation on the cassava and corn starches. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53 n.2 abr. 2010.

GONÇALVES, P.M.; NOREÑA, C.P.Z.; SILVEIRA, N.P.; BRANDELLI, A.. Characterization of starch nanoparticles obtained from *Araucaria angustifolia* seeds by acid hydrolysis and ultrasound, **LWT - Food Science and Technology**, v. 58 , p. 21-27, 2014.

HENRÍQUEZ, C.; ESCOBAR, B.; FIGUEROLA, F.; CHIFFELLE, I.; SPEISKY, H.; ESTÉVEZ, A. M. Characterization of piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, v.107, p.592–601, ago. 2008.

KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. da R.; COLUSSI, R.; DO EVANGELHO, J. A.; GUTKOSKI, L. C.; DIAS, A. R. G. Effect of single and dual heat–moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches. **Carbohydrate Polymers**, v.98, p.1578–1584, jul. 2013.

KOEHNLEIN, E. A.; CARVAJAL, A. E. S.; KOEHNLEIN, E. M.; COELHO-MOREIRA, J. da S.; INÁCIO, F. D.; CASTOLDI, R.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v.6, p. 512-518, nov. 2012.

LALITHA, S.; KRISHNAMURTHY, K.V.; ADAMS, S. J.; VENKATASUBRAMANIAN, P. An alternative method to localise starch grains and inulin crystals in plant tissue sections. **Journal of the Swamy Botanical Club. Madurai**, v. 29, p. 9-12, 2012.

LEITE, D. MC.; DE JONG, E. V.; NOREÑA, C. PZ.; BRANDELLI, A.. 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, mar. 2008.

LI, X.; GAO, W.Y.; HUANG, L.J.; WANG, Y.L.; HUANG, L.Q.; LIU, C.X. Preparation and physicochemical properties of carboxymethyl *Fritillaria ussuriensis* Maxim. starches, **Carbohydrate Polymers**, v. 80, 768-773, 2010.

LIU, Q. Understanding Starches and Their Role in Foods. In: CUI, S. W. (ed) **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 309-355.

LUCHESI, C. L.; FRICK, J. M.; PATZER, V. L.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 203-210, 2015.

MAYER, F. D.; GASPAROTTO, J. M.; KLAUCK, E.; WERLE, L. B.; JAHN, S. L.; HOFFMANN, R.; MAZUTTI, M. A. Conversion of cassava starch to ethanol and a byproduct under different hydrolysis conditions. **Starch-Stärke**, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998.** 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=97&word=crit%a9rios%20para%20utiliza%a7%a3o%20dos%20atributos%20baixo>>. Acesso em: 30 mai 2014.

OLIVEIRA, C.S.; ANDRADE, M.M.P.; COLMAN, T.A.D.; COSTA, F.J.O.G.; SCHNITZLER, E. Thermal, structural and rheological behaviour of native and modified waxy corn starch with hydrochloric acid at different temperatures, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.115, p. 13-18, 2014.

PANDEY, A; SOCCOL, C.R.; NIGAM P.; SOCCOL V.T.; VANDENBERGHE L.P.S.; MOHAN R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse, **Bioresource Technology**, v.74, p. 81-87, 2000.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. **Journal of Cereal Science**, V. 34, p. 1-17, 2001.

PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; KLEIN, B.; ZAVAREZE, E. R.; ELIAS, M. C.; GUTKOSKI, L. C.; HELBIG, E.; DIAS, A. R. G. Physicochemical., crystallinity, pasting and thermal properties of heat-moisture-treated pinhão starch. **Starch/Stärke**, v.64, p. 855–863, abr. 2012.

PUMACAHUA-RAMOS, A.; DEMIATE, I.M.; SCHNITZLER, E.; BEDIN, A.C.; TELIS-ROMERO, J.; LOPES-FILHO, J.F., Morphological, thermal and physicochemical characteristics of small granules starch from *Mirabilis jalapa* L, **Thermochimica Acta**, v. 602, p. 1–7, 2015.

RIBEIRO, L. S; CORDOBA L. P.; COLMAN, T. A. D.; OLIVEIRA, C. S.; ANDRADE, M. M. P.; SCHNITZLER, E. Influence of some sugars on the thermal., rheological and morphological properties of “pinhão” starch. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v. 117, p. 935-942, 2014.

SEVERO, M. G.; MORAES, K.; RUIZ, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. **Química Nova**, v. 33, n. 2, 2010.

SINGH; N., SINGH; J., KAUR; L., SODHI; N.S., GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources, **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SOUZA, P. M. D. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.

SPADA, J. C.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of b-carotene using native pinhão starch, modified pinhão starch and gelatin by freeze-drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 186–194, set. 2012b.

SPADA, J. C.; NOREÑA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. **Carbohydrate Polymers**, v.89, p. 1166–1173, abr. 2012a.

SRICHUWONG, S.; SUNARTI, T.C.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility, **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 529-538, 2005.

STAHL, J.A.; LOBATO, L.P.; BOCHI, V.C.; KUBOTA, E.H.; GUTKOSKI, L.C.; EMANUELLI, T. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **LWT – Food Science and Technology**, v.40, p. 1206-1214, jul. 2006.

STATIC. **Figura 2**.Disponível em: <http://static.oilproject.org/content/4978/53_4px-Amylopektin_Haworth_svg.png>. 2003. Acesso em: 29 mai. 2014.

THYS, R. C. S.; AIRES, A. G.; MARCZAK, L. D. F.; NOREÑA, C. P. Z. The effect of acid hydrolysis on the technological functional properties of pinhão (*Araucaria brasiliensis*) starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p. 89-94, fev. 2013.

THYS, R.C.S.; NOREÑA, C.P.Z.; MARCZAK, L.D.F.; AIRES, A.G.; CLADERA-OLIVERA, F. Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 100 , p.468–473, 2010.

VERSINO, F.; LÓPEZ, O.V.; GARCÍA, M.A.. Sustainable use of cassava (*Manihot esculenta*) roots as raw material for biocomposites development. **Industrial Crops Products**, v. 65, p. 79-89, 2015.

ZHANG, L.; XIE, W.; ZHAO, X.; LIU,Y.; GAO, W. Study on the morphology, crystalline structure and thermal properties of yellow ginger starch acetates with different degrees of substitution. **Thermochimica Acta**, v. 495, p. 57-62, 2009.

ZHAO, J.; CHEN,Z.; JIN, Z.; BUWALDA, P.; GRUPPEN, H.; SCHOLS, H.A. Effects of granule size of cross-linked and hydroxypropylated sweet potato starches on their physicochemical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63 p. 4646-4654, 2015.