

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia De Alimentos

LAYSE DO PRADO CORDOBA

**EFEITO DA MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS,
REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS DO AMIDO DE PINHÃO (*Araucaria
angustifolia*).**

PONTA GROSSA
2015

LAYSE DO PRADO CORDOBA

**EFEITO DA MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS,
REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS DO AMIDO DE PINHÃO (*Araucaria
angustifolia*).**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos
na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler

PONTA GROSSA
2015

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

C796 Cordoba, Layse do Prado
 Efeito da modificação enzimática nas
 propriedades térmicas, reológicas e
 estruturais do amido de pinhão (*Araucaria*
 angustifolia)/ Layse do Prado Cordoba.
 Ponta Grossa, 2015.
 58f.

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

 Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler.

 1.*Araucaria angustifolia*. 2.Hidrólise
 enzimática. 3.Amido modificado. 4.Análise
 térmica. I.Schnitzler, Egon. II.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Ciência e Tecnologia de
 Alimentos. III. T.

CDD: 664.7

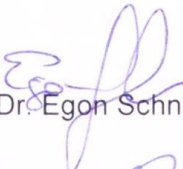
TERMO DE APROVAÇÃO

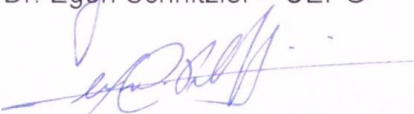
LAYSE DO PRADO CORDOBA

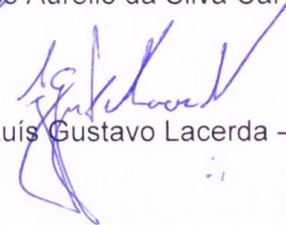
EFEITO DA MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NAS PROPRIEDADES
TÉRMICAS, REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS DO AMIDO DE
PINHÃO (*ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA*).

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. Egon Schnitzler – UEPG


Prof. Marco Aurélio da Silva Carvalho, Filho – U POSITIVO


Prof. Dr. Luís Gustavo Lacerda – UEPG

Ponta Grossa, 03 de setembro de 2015.

Dedico essa dissertação à minha mãe Marly, irmã Nicolly e meu amor Jonathan por acreditarem em mim e estarem em todos os momentos comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pelo dom da vida e por toda oportunidade de crescimento e bênçãos que Ele tem me dado sempre.

A minha mãe Marly, que além de mãe, é minha amiga, e sempre estimulou minha carreira acadêmica e escolhas profissionais, acreditando no meu potencial.

A minha irmã/amiga Nicolly por estar sempre presente, e apesar da distância esta sempre comigo.

Ao Jonathan, meu amor e melhor amigo, que além de acreditar ser possível, teve paciência em todos os momentos da elaboração dessa dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Egon Schnitzler por todos os conhecimentos repassados a mim, pelo auxílio, orientação e oportunidade de crescimento que me proporcionou desde meu início na pesquisa, com a iniciação científica.

Aos meus amigos Camila e Lucas, pelo companheirismo, ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que fez toda a diferença.

RESUMO

O amido é uma fonte energética de grande destaque na alimentação humana e possui inúmeras aplicações industriais, como espessante, estabilizante coloidal, geleificante, agente de volume, retentor de água e agente de viscosidade. O pinhão, semente da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, possui alto conteúdo amiláceo (entre 68-72 g 100g⁻¹ em matéria seca), o qual foi a matéria-prima do presente estudo. O objetivo desse trabalho foi analisar o amido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) nativo e modificado enzimaticamente por meio de composição centesimal, técnicas termoanalíticas (termogravimetria e análise térmica diferencial - TG/DTA, calorimetria exploratória diferencial - DSC), técnicas estruturais (microscopia eletrônica de varredura - MEV e difratometria de raios X - DRX) e reológicas (propriedade de pasta - RVA). As amostras de amido de pinhão foram extraídas em laboratório por método aquoso e modificadas com o complexo enzimático, composto de α -amilase (EC 3.2.1.1), amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) e Aspergillopepsin 1 (EC 3.4.23.18). A hidrólise ocorreu no período de 12h, 24h e 36h, na temperatura de 31 °C e pH de 5,0. Por meio da composição centesimal foi possível quantificar cada componente do amido de pinhão. Pelo TG, observou-se que a hidrólise enzimática elevou a estabilidade térmica das amostras. Na análise de DSC observou-se uma diminuição da ΔH_{gel} após a modificação enzimática. Pelo RVA observou-se uma diminuição na tendência de retrogradação em todas as amostras tratadas. Por meio da análise DRX caracterizou-se o padrão do amido de pinhão como tipo C e as micro-imagens (MEV) possibilitaram o estudo da estrutura e a superfície dos grânulos do amido. Dessa forma foram determinadas as propriedades térmicas, estruturais e reológicas do amido de pinhão nativo e hidrolisado enzimaticamente, para uma futura aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica ou papelreira.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*, hidrólise enzimática, amido modificado, análise térmica.

ABSTRACT

Starch is used as an important energy source in human diet and furthermore, has numerous industrial applications, such as thickening, colloidal stabilizer, gelling, bulking agent, water retaining and viscosity agent. The pinhão, seed of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, has a high starch content (between 68-72 g 100 g⁻¹ dry matter), and was the object of this study. This work aims to analyze the pinhão starch (*Araucaria angustifolia*) in its native and enzymatically modified form through chemical composition, thermoanalytical techniques (Thermogravimetry and Differential Thermal Analysis - TG / DTA; Differential Scanning Calorimetry - DSC), structural techniques (Scanning Electron Microscope - SEM and X-ray Diffraction - XRD) and rheological (Rapid Visco Analyzer - RVA). The pinhão starch samples were extracted in laboratory by aqueous method and modified with an enzyme complex composed of α -amylase (EC 3.2.1.1), amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) and aspergillopepsin 1 (EC 3.4.23.18). The hydrolysis occurred in the period of 12h, 24h and 36h at the temperature of 31 °C and pH 5.0. Through chemical composition, it was possible to quantify each component of pinhão starch. Through TG analysis, it was observed that enzymatic hydrolysis increased the thermal stability of the samples. In the DSC analysis a decrease of ΔH_{gel} after enzymatic modification was noted. A decrease in retrogradation in all treated samples was observed utilising RVA. XRD analysis allowed to characterise the pinhão diffraction pattern as C-type, and using the micro-images (SEM), it was possible to study the structure and surface of starch granules. Thus it, was determined the thermal, structural and rheological properties of native and hydrolyzed enzymatically pinhão starch, for a future application in the food, pharmaceutical or paper industry.

Keywords: *Araucaria angustifolia*, enzymatic hydrolysis, modified starch, thermal analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estrutura de anidroglicose.....	14
FIGURA 2 - Semente de pinhão brotando	16
FIGURA 3 - Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido.....	19
FIGURA 4 - Estrutura química da amilose.	20
FIGURA 5 - Estrutura química da amilopectina.....	21
FIGURA 6 – Grânulo de amido sob luz polarizada, evidenciando a cruz de Malta. ..	23
FIGURA 7 - Curva genérica para a análise de DSC ou DTA.	28
FIGURA 8 - Curva típica obtida em análise no RVA, apresentando os parâmetros quantificados para propriedade de pasta.	29
FIGURA 9 - Curvas TG-DTA das amostras: amido de pinhão nativo (A) e as modificadas enzimaticamente por 12 h (B), 24h (C) e 36h (D).....	41
FIGURA 10 - Curvas DSC de: amido de pinhão nativo (A) e os modificados por ação enzimática (B, C e D)	43
FIGURA 11 - Curvas RVA para a amostra de amido de pinhão nativo (A) e os modificados por ação enzimática (B, C e D).	45
FIGURA 12 - Difrátogramas de Raios X das amostras de: amido de pinhão nativo (A), e amido de pinhão modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).	47
FIGURA 13 – Micro-imagens obtidas no MEV (com a ampliação de 2.00kx) das amostras de amido de pinhão nativo (A), e as modificadas enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição centesimal (g 100 g ⁻¹) das sementes da <i>Araucaria angustifolia</i>	17
TABELA 2 - Conteúdo de amilose de amidos de diversas fontes.	19
TABELA 3 - Intervalos de temperatura de gelatinização de diferentes amidos.....	23
TABELA 4 - Composição centesimal das amostras de: amido de pinhão nativo (A), e modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).	37
TABELA 5 - Resultados TG/DTA das amostras de: amido de pinhão nativo (A), e amido de pinhão modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).....	39
TABELA 6 - Resultados de DSC para as amostras A, B, C e D.....	42
TABELA 7 - Resultados RVA das amostras: amido de pinhão nativo (A), e amido de pinhão modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).....	44
TABELA 8 - Grau de cristalinidade relativa para as amostras de: amido de pinhão nativo (A) e os modificados com o complexo enzimático (B, C e D).	46
TABELA 9 - Picos obtidos por meio dos difratogramas de raios X para a amostra de amido de pinhão nativo e as modificadas por ação enzimática.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Da – Diâmetro médio

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

DTA – Análise Térmica Diferencial (DTA)

TG – Termogravimetria

RVA – Rápido Visco-Analisador

DRX – Difractometria de Raios X

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mPa s – Milipascal segundo

T_o – Temperatura “on set”

T_p – Temperatura de pico

T_c – Temperatura de conclusão

ΔH_{gel} – Entalpia de gelatinização

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS.....	13
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1.	AMIDO	14
3.1.1.	O PINHÃO COMO FONTE DE AMIDO	15
3.1.2.	ESTRUTURA QUÍMICA	18
3.1.2.1.	AMILOSE	20
3.1.2.2.	AMILOPECTINA	20
3.1.3.	PROPRIEDADES DOS GRÂNULOS DE AMIDO	21
3.1.3.1.	GELATINIZAÇÃO.....	21
3.1.3.2.	RETROGRADAÇÃO	24
3.2.	AMIDOS MODIFICADOS	24
3.2.1.	MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	24
3.2.1.1.	COMPLEXO ENZIMÁTICO DISTILLASE® SSF	25
3.2.1.1.1.	α -AMILASE (EC 3.2.1.1).....	25
3.2.1.1.2.	AMILOGLUCOSIDASE (EC 3.2.1.3).....	26
3.2.1.1.3.	ASPERGILLOPEPSIN 1 (EC 3.4.23.18).....	26
3.3.	TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS.....	27
3.3.1.	TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA).....	27
3.3.2.	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	27
3.3.3.	PROPRIEDADES DE PASTA (RVA)	28
3.3.4.	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX).....	30
3.3.5.	MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV)	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1.	MATERIAL	32
4.2.	MÉTODOS	32
4.2.1.	EXTRAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO	32
4.2.2.	MODIFICAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO POR AÇÃO ENZIMÁTICA.....	33
4.2.3.	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS AMIDOS DE PINHÃO	33
4.2.4.	TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA).....	33

4.2.5.	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	34
4.2.6.	PROPRIEDADES DE PASTA (RVA)	34
4.2.7.	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX).....	35
4.2.8.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	35
4.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1.	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS AMIDOS DE PINHÃO	37
5.2.	TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)	38
5.3.	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	42
5.4.	PROPRIEDADE DE PASTA (RVA)	43
5.5.	DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X (DRX)	45
5.6.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	48
6.	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

O amido é uma fonte energética de grande destaque na alimentação humana. Tal composto é o principal carboidrato de reserva produzido pelas plantas e consumido pelo homem. O fato de ser armazenado em grânulos insolúveis em água e de ser facilmente extraído o torna único na natureza, com ampla possibilidade de utilização diretamente na dieta humana ou na indústria alimentícia. Esse polímero é constituído basicamente por dois componentes: amilose e amilopectina, ligados entre si por ligações do tipo α 1-4 em cadeias lineares e ligações α 1-6 nas ramificações. O amido contribui consideravelmente para as propriedades de textura de muitos alimentos e tem várias aplicações industriais, como: espessante, estabilizante coloidal, geleificante, agente de volume, retentor de água e agente de viscosidade.

O pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, é consumido no sul e sudeste do Brasil principalmente na sua forma *in natura*, assada ou cozida. Esta semente é composta de aproximadamente 34-36 g 100g⁻¹ de amido e possui um conteúdo muito baixo de outros componentes, como lipídeos e proteínas, o que o torna interessante para obtenção de amido e utilização na indústria de alimentos.

Muitos amidos em sua forma nativa apresentam limitações que os tornam menos adequados para a diversidade de aplicações requeridas. Por essa razão, o amido utilizado para fins industriais necessita ser modificado (química, física ou enzimaticamente) antes de sua utilização, com o objetivo de melhorar as propriedades físicas do polímero em consonância com sua aplicação específica. As modificações por meio enzimático consistem no tratamento do amido, no estado seco ou úmido, em presença de quantidades moderadas de enzimas, tendo como resultado produtos solubilizados ou parcialmente hidrolisados.

Esse trabalho teve como objetivo analisar o amido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) nativo e modificado enzimaticamente por meio de composição centesimal, técnicas termoanalíticas (termogravimetria e análise térmica diferencial - TG/DTA, calorimetria exploratória diferencial - DSC), técnicas estruturais (microscopia eletrônica de varredura - MEV e difratometria de raios X - DRX) e reológicas (propriedade de pasta - RVA).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi analisar o amido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) nativo e modificado enzimaticamente por meio de composição centesimal, técnicas termoanalíticas (termogravimetria e análise térmica diferencial - TG/DTA, calorimetria exploratória diferencial - DSC), reológicas (propriedade de pasta - RVA) e técnicas estruturais (difratometria de raios X - DRX e microscopia eletrônica de varredura - MEV).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o amido de pinhão e modificá-lo com o emprego do complexo enzimático (amilase, glucoamilase e *Aspergillopepsin 1*);
- Determinar as propriedades térmicas (estabilidade, gelatinização e entalpia) do amido em estudo, em seu estado nativo, durante e após o tratamento enzimático;
- Verificar a cristalinidade do material sólido a partir da difratometria de raios X (DRX) e a estrutura através da microscopia de varredura eletrônica (MEV).
- Caracterizar as propriedades reológicas (RVA) do amido nativo e modificado, frente a diferentes graus de modificação.

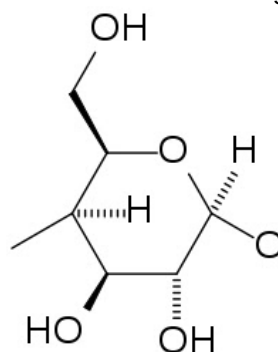
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. AMIDO

O amido é um polissacarídeo, hidrato de carbono polimérico, de origem vegetal, normalmente obtido de cereais (milho comum, milho ceroso, milho de alto teor de amilose, trigo, arroz), tubérculos e raízes, em especial batata e mandioca. As propriedades dos amidos podem variar conforme sua fonte (raízes, tubérculos, sementes, cereais) e entre as diferentes variedades de amido, varia também a sua composição, a morfologia, estrutura molecular e arranjo de amilose e amilopectina dentro do grânulo (HOOVER, 2010).

Esse polissacarídeo é a principal fonte de energia provida dos alimentos na dieta humana. Apesar de todos os amidos, de diversas fontes botânicas, serem quimicamente iguais, o amido de cada fonte botânica difere em suas propriedades funcionais específicas e em sua possível aplicação. O amido chama atenção dos pesquisadores por ser um biopolímero extremamente versátil e possível de ser empregado em diversos seguimentos industriais, como: setor alimentar, papel e celulose, têxtil, farmacêutico, entre outros. É constituído por unidades de anidroglicose (Figura 1) e existe sob a forma de grânulos, que podem mudar de forma ou tamanho de acordo com sua origem botânica, variando de 1 a 100 µm (BELLO-PÉREZ et al., 2006; LOBO; SILVA, 2003).

FIGURA 1 - Estrutura de anidroglicose.



Fonte: Adaptado de SCIENCE (2014).

O amido, quimicamente, é obtido no final do processo fotossintético dos vegetais (encontrado em sementes, raízes e tubérculos), sendo este a maior fonte de reserva energética dos mesmos. Entre todos os polissacarídeos, somente o

amido é produzido em pequenos agregados individuais, chamados comumente como grânulos, os quais são sintetizados e adquirem tamanhos e formas, prescritos pelo sistema biossintético de cada fonte botânica (BALDWIN, 2001).

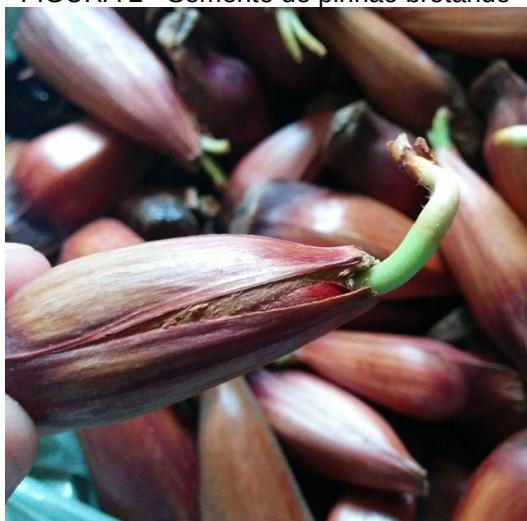
Para Mendes; Bora; Ribeiro (2012) o fato dos grânulos do amido serem insolúveis em água e de serem facilmente extraíveis, o torna único na natureza, com ampla possibilidade de utilização diretamente na dieta humana ou na indústria alimentícia. O amido na indústria de alimentos contribui consideravelmente para as propriedades de textura de muitos alimentos e pode ser utilizado como espessante, estabilizante coloidal, geleificante, agente de volume, retentor de água e agente de viscosidade.

3.1.1. O PINHÃO COMO FONTE DE AMIDO

A árvore *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, é uma espécie encontrada na América do Sul, que compõe a Mata Atlântica. Pertence a Floresta Ombrófila Mista (encontro das floras Temperada Austro-brasileira e Tropical Afro-brasileira) que é conhecida como floresta de pinheiros, pinhais ou mata de araucária. Seu desenvolvimento ocorre em locais de grandes altitudes (500 e 1500 m), com temperatura anual média entre 11,5 e 21 °C (BELLO-PÉREZ et al., 2006; CORDENUNSI et al., 2004).

As sementes do pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*) são conhecidas por pinhões (Figura 2) e possuem casca de cor marrom avermelhada. Sua polpa possui a parte comestível, porém para o consumo humano é necessário o abrandamento da textura através do cozimento (CORDENUNSI et al., 2004; DAUDT et al., 2014). Sua obtenção acontece por coleta manual, com produção anual, no período de abril a agosto. Devido ao desmatamento irracional da *Araucaria angustifolia* para fins comerciais ou para a agricultura tradicional, esta árvore está em risco de extinção (CLADERA-OLIVERA, 2008; SPADA et al., 2013).

FIGURA 2 - Semente de pinhão brotando



Fonte: A autora.

Historicamente o Pinheiro do Paraná tem grande importância para o comércio de sua madeira. O pinhão já era utilizado como fonte de alimentos para as tribos indígenas e após a coleta a semente era desidratada para posterior consumo (quando consumida era diretamente assada, cozida ou transformada em farinha, para utilização em diversos produtos). Hoje em dia o pinhão ainda constitui um alimento tradicionalmente consumido cozido ou assado na região Sul do Brasil, consumido durante o inverno, nos meses de safra (maio a agosto) (CLADERA-OLIVEIRA et al., 2008; WOSIACKI; CEREDA, 1984).

O pinhão é utilizado também como ingrediente na forma de farinha crua para composição de vários pratos, e é considerado uma fonte de amido (aproximadamente 34-36 g 100 g⁻¹ do grão), fibra alimentar, de magnésio e cobre, além de produzir um baixo índice glicêmico após seu consumo. Na literatura ainda são escassos os aspectos tecnológicos e nutricionais do pinhão, mas estudos recentes sugerem que a semente da *Araucaria angustifolia* é uma fonte potencial para a extração de amido para fins industriais (BELLO-PÉREZ et al., 2006; CORDENUNSI et al., 2004; DAUDT et al., 2014; STAHL et al., 2007).

Por possuir alto teor de conteúdo amiláceo (entre 68-72 g 100 g⁻¹ em matéria seca), o pinhão é considerado uma boa fonte de carboidratos complexos. O amido do pinhão pode ser facilmente obtido por decantação, após moagem das sementes sem casca e dispersão da farinha em água, e posterior filtração. A composição do pinhão obtida por Capella; Penteado; Balbi, (2009) está exposta na Tabela 1. O consumo das sementes produz um baixo índice glicêmico, quando comparado com

o consumo do pão branco (BELLO-PÉREZ et al., 2006; CLADERA-OLIVERA, 2008; CORDENUNSI et al., 2004; STAHL et al., 2007).

TABELA 1 – Composição centesimal (g 100 g⁻¹) das sementes da *Araucaria angustifolia*.

Amostra	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL EM BASE SECA (g 100 g ⁻¹)					
	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	Fibra Alimentar	Carboidratos
Pinhão fresco e cru	51,16± 0,29	6,59± 0,15	7,38±0,31	2,85± 0,36	15,34 ± 0,25	67,84
Pinhão fresco e cozido	49,70± 0,25	6,31± 0,15	6,27± 0,31	3,57± 0,68	16,88 ± 0,23	66,96

Fonte: Adaptado de CAPELLA; PENTEADO; BALBI (2009).

Cordenunsi et al. (2004) relata que o pinhão é uma boa fonte de hidratos de carbono complexos (amido e fibras alimentares), Mg e Cu, tem baixos teores de proteína (~3 g 100 g⁻¹), lipídios, (~1 g 100 g⁻¹), açúcares solúveis (~2,4 g 100 g⁻¹) e menos de 0,2 mg de compostos fenólicos, detectados em 100 g da semente.

Estudos mostraram que o amido de pinhão apresentou grânulos de tamanho inferior em comparação ao amido de milho e mandioca. O grânulo de amido de pinhão possui formato esférico e com superfície irregular (CORDENUNSI et al., 2004; WOSIACKI; CEREDA, 1985).

O teor de amilose encontrado por alguns autores no amido de pinhão nativo varia de 23,54% a 34%. Segundo Cordenunsi et al. (2004) o amido de pinhão possui aproximadamente 34% de teor de amilose, Conto (2009) encontrou 27,25%, Bello-Pérez et al. (2006) 25%, Stahl et al. (2007) 23,54% e Thys et al., (2010) 26,3% de amilose.

O amido de pinhão possui uma estrutura cristalina do tipo C. Sabe-se que amidos que possuem estrutura cristalina do tipo A, apresentam picos fortes na difração de 2 θ de 15 ° e 23 °, e um pico duplo à 17 ° e 18 °. Os amidos do tipo B, apresentam um pico forte a 17°, e pequenos picos nos ângulos 15 °, 20 °, 22 °, 24 ° e um pico tipo a 5,6°. Já o amido do tipo C, que é o caso do amido de pinhão, é uma mistura das formas cristalinas do tipo A e B dentro de um mesmo grânulo (CAI et al., 2014b; PINTO et al., 2015).

3.1.2. ESTRUTURA QUÍMICA

As unidades de anidroglicose que formam o amido são organizadas em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A amilose praticamente não apresenta ramificações, sendo que as unidades de glucose são conectadas por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) e a porcentagem de ramificações α 1,6 é menor do que 1 %. A amilopectina é altamente ramificada e possui cadeias de resíduos de glucose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α 1,4 com aproximadamente 5 % de ramificações α (1,6) (BALL; WAL; VISSER, 1998; MYERS et al., 2000).

O teor de amilose influencia grandemente as funcionalidades e propriedades físico-químicas do amido, por exemplo, o amido com alto teor de amilose tem uma elevada resistência à digestão e fornece muitos benefícios de saúde para humanos (LIN et al., 2016).

Na Tabela 2 é apresentado o percentual de amilose, em diversas fontes botânicas. Os amidos normalmente apresentam em torno de 25 % de amilose, entretanto algumas espécies mutantes, chamadas de amidos com alto teor de amilose, apresentam um teor de até 80 %. Já nos amidos chamados cerosos, a amilose não está presente, então nestes só contêm amilopectina (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004).

A diferença do amido ceroso para o comum é que nele, se encontra no máximo 5 % de amilose, enquanto o amido comum, por exemplo, o de mandioca, encontra-se em torno de 20 % de amilose e 80 % de amilopectina. Amidos com baixos teores de amilose são de grande interesse para a indústria de alimentos, por não sofrerem retrogradação, evitando assim que o alimento endureça e por consequência aumentando sua vida de prateleira (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004).

As proporções de amilose e amilopectina variam, resultando em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais muito diferentes, que podem afetar as suas aplicações industriais (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

TABELA 2 - Conteúdo de amilose de amidos de diversas fontes.

Fontes de amido	Teor de amilose (%)
Arroz	16
Arroz Ceroso *	0
Banana	21
Batata	18
Batata Doce	18
Ervilha	30
Mandioca	18
Milho	25
Milho Ceroso *	0
Milho com alto teor de amilose	80
Trigo	24

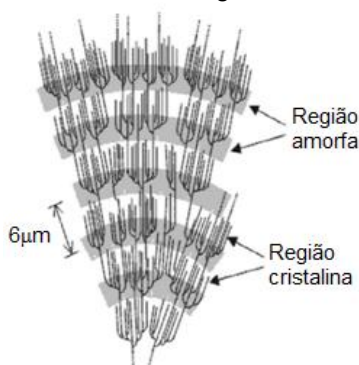
* Amido contendo apenas amilopectina

Fonte: CEREDA (2002); DENARDIN; SILVA (2009).

A maioria dos amidos é composto por 20 a 30 % de amilose e 70-80 % de amilopectina, variando de acordo com sua origem botânica. O arranjo estrutural dessas macromoléculas (amilose e amilopectina) permite a formação de áreas cristalinas e amorfa dos grânulos. As áreas cristalinas mantêm a estrutura dos grânulos, controlam o comportamento da água e os tornam relativamente resistentes ao ataque enzimático e químico (BILIADERIS, 1991).

O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos de amido leva a formação de zonas de deposição de densidade média. A amilopectina se encontra na região mais densa ou cristalina, onde sua parte linear é responsável pela origem desta cristalinidade (Figura 3). As áreas amorfas são formadas por cadeias de amilose e ramificações da amilopectina. Grânulos de amido no estado nativo apresentam normalmente uma cristalinidade entre 15 a 45 % (DENARDIN; SILVA, 2009).

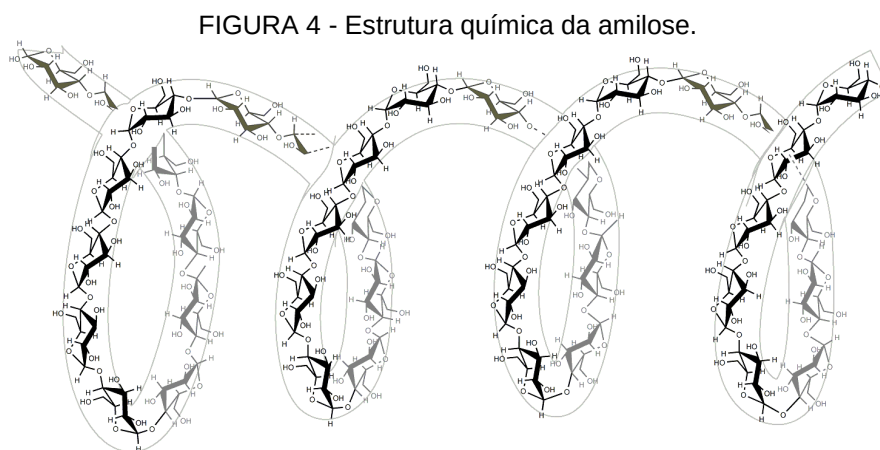
FIGURA 3 - Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido.



Fonte: Adaptado de DENARDIN; SILVA (2009).

3.1.2.1. AMILOSE

A amilose é um polímero essencialmente linear com ligações α (1,4) entre unidades de α -D-glucopiranosil, com peso molecular na ordem de 250.000 Daltons (cerca de 1500 unidades de glicose) (Figura 4). A amilose apresenta conformação helicoidal e tem a propriedade de formar um complexo de cor azul-escura com o iodo (ALVES et al., 2012).



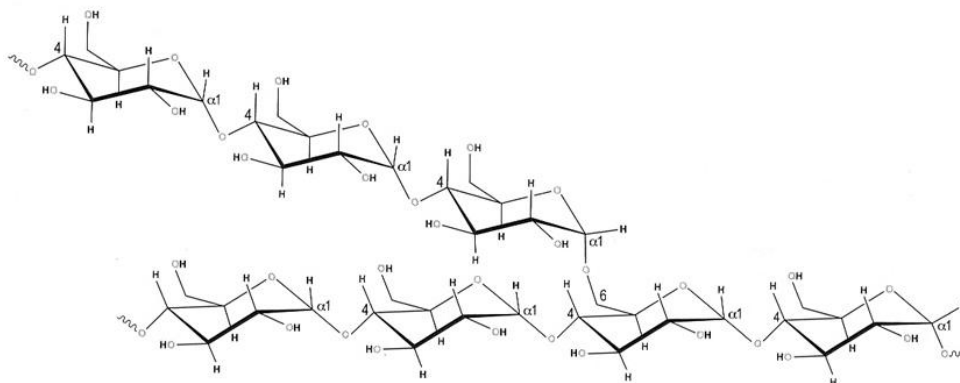
Fonte: MIGUEL et al. (2013).

Os amidos podem ser classificados em grupos diferentes, referente a quantidade de amilose que possui. Esses grupos são: amidos cerosos (“waxy” em inglês), que possuem pequenas quantidades de amilose (em torno de 1 %), amidos normais, que contêm entre 17 % a 24 % de amilose e, amidos de alta amilose, que possuem de 70 % ou mais de amilose (BELLO-PÉREZ et al., 2006; WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

3.1.2.2. AMILOPECTINA

A amilopectina é uma molécula mais complexa que a amilose, seu tamanho é maior, possuindo um grau de polimerização de 10^5 a 10^7 . Ela é constituída por unidades de α -D-glucopiranosil, como a amilose, ligadas entre si por ligações glicosídicas α 1,4, mas por apresentar ramificações, como mostra a Figura 5, apresentando 4-5 % de ligações do tipo α 1,6. O comprimento das ramificações é variável, mas normalmente possuem entre 20 a 30 unidades de glicose. O peso molecular da amilopectina varia entre 50 e $5 \cdot 10^8$ Daltons (ALVES et al., 2012).

FIGURA 5 - Estrutura química da amilopectina.



Fonte: Adaptado de CORRADINI et al. (2005).

3.1.3. PROPRIEDADES DOS GRÂNULOS DE AMIDO

3.1.3.1. GELATINIZAÇÃO

Quando em presença de água fria, o amido tem no máximo 30 % de água penetrada nas regiões amorfas do grânulo. Entretanto, se o amido for aquecido em presença de água, suas moléculas vibram intensamente e as ligações de hidrogênio intermoleculares são quebradas, permitindo que a água penetre mais profundamente, nas micelas, e quanto maior a temperatura, mais água entra nas micelas (LOBO; SILVA, 2003; SOUZA; ANDRADE, 2000).

Com o aquecimento contínuo em água abundante, o amido se torna transparente, pois há uma perda total das zonas cristalinas, acabando com a birrefringência. A temperatura na qual a birrefringência desaparece é chamada de ponto de gelatinização do amido ou temperatura de gelatinização. Entretanto, quando se aquece o amido em presença de pouca água, o fenômeno de rompimento dos grânulos é chamado de fusão (SOUZA; ANDRADE, 2000).

A gelatinização é definida pelo colapso (rompimento) da ordem das moléculas dentro dos grânulos, o que ocasiona uma série de mudanças nas propriedades, como: aumento do tamanho dos grânulos, fusão dos cristais, perda de birrefringência, desenvolvimento de viscosidade e solubilização do amido. O fenômeno de gelatinização se inicia na região amorfa do grânulo (hilo) e segue rapidamente para a periferia (LOBO; SILVA, 2003; SINGH et al., 2003).

O empastamento é o fenômeno que acontece após a gelatinização, na dissolução do amido. Nele ocorre o inchamento dos grânulos e há separação dos componentes granulares moleculares e, eventualmente, total rompimento dos grânulos. Nesta etapa há um aumento na viscosidade da solução (BENINCA et al., 2012a).

A perfeita cristalinidade durante o processo é refletida na temperatura de gelatinização para Singh et al. (2003). A gelatinização e as propriedades de inchamento são controladas em parte pela estrutura molecular da amilopectina (comprimento de cadeia, extensão da ramificação, massa molecular e polidispersividade), composição do amido (razão amilose/amilopectina e conteúdo de fósforo) e arquitetura do grânulo (razão entre região cristalina e amorfa).

A temperatura inicial de gelatinização, ou também conhecida como temperatura *onset* (T_o) é característica de cada amido, e se encontra normalmente no intervalo de 55 a 75 °C (Tabela 3). Essa temperatura é determinada pela concentração e método de observação do amido, pelo tipo de grânulo e heterogeneidades dentro da população de grânulos sob observação.

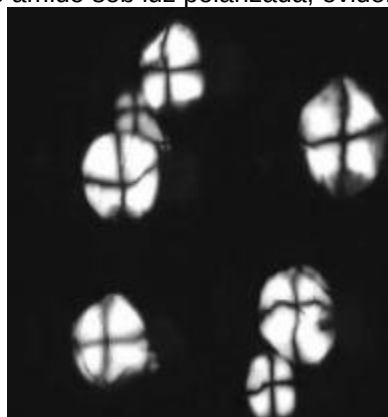
TABELA 3 - Intervalos de temperatura de gelatinização de diferentes amidos

Amido	Intervalo de Temperatura de Gelatinização (°C)
Abacate	67-75
Amêndoa de manga	76-79
Arroz	61-77
Banana Verde	67-76
Batata	56-66
Flor (<i>Fritillaria ussuriensis</i> Maxim)	63-76
Inhame chinês (<i>Dioscorea opposita</i> Thunb)	73-84
Mandioca	58-70
Mandioca Orgânica	54-78
Milho	62-72
Milho Ceroso	62-75
Pinhão	53-71
Sorgo	68-75
Trigo	52-63

Fonte: Adaptado de ADAMOVIČZ et al. (2015), CEREDA (2002), CORDOBA et al. (2013), JIANG et al., 2011, MALUCELLI et al., (2014), MALUCELLI et al., (2015), MENDES et al. (2012) e RIBEIRO et al. (2014).

Na temperatura *onset* (T_o) as pontes de hidrogênio se tornam fracas e são facilmente rompidas, o que ocasiona a redução da cristalinidade do grânulo pela ruptura das pontes de hidrogênio estabilizadoras dessa estrutura cristalina interna (quando é atingida a temperatura específica de cada amido), possibilitando a entrada de água e fazendo com que o grânulo se rompa perdendo sua birrefringência (não se visualiza mais a cruz de Malta sob luz polarizada (Figura 6) (LOBO; SILVA, 2003; SINGH et al., 2003).

FIGURA 6 – Grânulo de amido sob luz polarizada, evidenciando a cruz de Malta.



Fonte: BLASZCZAK et al. (2005).

3.1.3.2. RETROGRADAÇÃO

Quando dissoluções ou pastas de amido são deixadas em repouso por algum tempo, se inicia uma série de mudanças em suas propriedades reológicas. As soluções diluídas perdem viscosidade, mas as pastas concentradas e os géis começam a tornar-se pegajosos e começam a exsudar água. Ambos os acontecimentos são devidos a um fenômeno denominado retrogradação, envolvendo apenas as moléculas de amilose (DENARDIN; SILVA, 2009; LOBO; SILVA, 2003).

A retrogradação do amido é o evento que ocorre quando as moléculas do amido se reassociam em forma de uma estrutura mais ordenada (duplas hélices), tornando-se menos solúveis. Os cristais começam a dar forma eventualmente e há um aumento gradual na rigidez da pasta, ocorrendo a separação da fase entre polímero e solvente, ou seja, há saída da água ligada às cadeias de amilose, fenômeno denominado sinérese. O conteúdo de amilose presente no amido é considerado um dos fatores que influenciam no acontecimento da retrogradação. Uma maior quantidade de amilose tem sido relacionada a uma maior tendência a retrogradação (LOBO; SILVA, 2003; SINGH et al., 2003).

3.2. AMIDOS MODIFICADOS

3.2.1. MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Na forma nativa, o amido muitas vezes apresenta-se limitado quanto a sua aplicação. Dessa forma, os amidos são muitas vezes modificados por tratamentos físicos, químicos ou processos enzimáticos para fornecer propriedades funcionais específicas (HOOVER, 2010).

Segundo Fellows (2006) existem inúmeras vantagens para a utilização de enzimas na hidrólise amilácea quando comparada com a modificação química, a qual é largamente aplicada nas indústrias. No geral as reações enzimáticas necessitam de condições mais brandas de temperatura e pH, gerando um menor impacto no meio ambiente durante a modificação do amido, por isso são chamadas de tecnologia limpa. Outra vantagem segundo Severo et al. (2010) a utilização de enzima é interessante por sua alta especificidade, a qual possibilita obtenção de

produtos com propriedades químicas e físicas, dentro do padrão desejado e com menos produtos secundários. Kim et al. (2015) afirma que apesar dos amidos modificados quimicamente serem melhores quanto a resistência, os produtores de alimentos estão evitando o seu uso, por questões de segurança ambiental e alimentar.

Ferreira et al. (2014) afirma que a hidrólise enzimática destaca-se entre as técnicas industriais utilizadas na produção de amidos modificados, entretanto alguns fatores podem influenciar na taxa de hidrólise, como: origem botânica e tamanho dos grânulos do amido, além do sistema enzimático utilizado.

3.2.1.1. COMPLEXO ENZIMÁTICO DISTILLASE® SSF

3.2.1.1.1. α -AMILASE (EC 3.2.1.1)

A α -amilase (EC 3.2.1.1 ou 1,4- α -D-glucano gluconoidrolase) é uma endoenzima, por isso hidrolisa o amido a partir do seu interior, resultando na formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de diferentes comprimentos. Essa enzima é responsável pela quebra de ligações do tipo α (1,4) internas ao polissacarídeo e é também chamada de enzima dextrinizante (AMARAL et al., 2007).

Segundo Gupta et al. (2003) as amilases industrialmente, têm substituído o uso de ácidos, na hidrólise de amidos e representam a maior parte do mercado de enzimas no mundo (25 a 33%) (NGUYEN et al., 2002). São utilizadas em diferentes aplicações, como na indústria alimentícia, têxtil e papelreira.

A α -amilase quebra somente as ligações glicosídicas α (1-4), ou seja, as ligações α (1-6) não são quebradas por essa enzima. A ação da α -amilase sobre a amilose acontece em duas etapas específicas: na primeira etapa há um ataque aleatório e rápido, tendo como produtos a maltose e maltotriose, a segunda etapa é no geral mais lenta e nela há formação de glicose e maltose. Quando a α -amilase age sob a amilopectina resulta em glicose, maltose e α -dextrinas limite, a qual é um oligossacarídeo formado por quatro ou mais unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,6 (BUCKERIDGE; SANTOS; TINÉ, 2000).

3.2.1.1.2. AMILOGLUCOSIDASE (EC 3.2.1.3)

A amiloglucosidase (α 1,4- glucanoglucohidrolase, EC 3.2.1.3), também chamada de glucoamilase, é uma enzima hidrolítica que catalisa a quebra das ligações glicosídicas α 1,4 a partir de uma extremidade não redutora das moléculas de amilose ou amilopectina dos grânulos do amido e oligossacarídeos relacionados liberando 3-D-glucose. Em menor velocidade a glucoamilase também atua hidrolisando as ligações α 1,6 (LEMOS et al., 2003).

A glucoamilase (GA) possui origem de microrganismos, plantas e animais. Entretanto, as enzimas disponíveis comercialmente são, em grande parte, produzidas de origem fúngica, de linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus*. Dentre estas, a produzida a partir do *Aspergillus* é a mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno de pH 4,5, e temperaturas de 50 a 55 °C, mas ela é rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60 °C (BRUMM, 1998).

O uso da amiloglucosidase é normalmente em amidos liquefeitos junto a α -amilase, para a obtenção de produtos que podem servir de substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas (FELLOWS, 2006; PANDEY et al., 2005).

Essa enzima é muito utilizada na indústria alimentícia a fim de produzir xaropes com alto teor de glicose e também é utilizada na produção de álcool e xaropes com alto teor de frutose (BRUMM, 1998).

3.2.1.1.3. ASPERGILLOPEPSIN 1 (EC 3.4.23.18)

Essa enzima pertence à classe das hidrolases, e atua nas ligações peptídicas ocasionando então a hidrólise de proteínas com uma ampla especificidade. Ela não é indicada para a utilização na indústria de laticínios com a finalidade de coagular do leite (EC-PDB, 2014). É muito utilizada na indústria de fabricação de álcool de milho.

3.3. TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

3.3.1. TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

As variações de massa são continuamente registradas como função do tempo (t) e/ou temperatura (T) sob determinadas condições atmosféricas e podem ser observadas pela termogravimetria (TG). Os experimentos são feitos utilizando uma termobalança de elevada sensibilidade, precisão e de rapidez na resposta quanto às variações de massa. Nas curvas TG, os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa que a amostra sofreu, permitindo assim a obtenção dos dados que poderão ser utilizados para fins quantitativos (IONASHIRO, 2004).

Nas curvas TG, os desníveis em relação ao eixo das ordenadas correspondem as variações de massa que a amostra sofreu e fornecem dados que são usados para calcular as perdas dessa massa. Na DTA (análise térmica diferencial) se faz a medição contínua das temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte, conforme há o aquecimento ou resfriamento deles em um forno. As medições realizadas são consideradas diferenciais, pois registra a diferença entre a temperatura da referência T_r , e a da amostra T_a , ou seja ($T_r - T_a = \Delta T$), em função de temperatura/tempo, considerando que o aquecimento e/ou resfriamento são sempre feitos em ritmo linear ($dT/dt = Cte$) (IONASHIRO, 2004).

Por meio da DTA é possível acompanhar o efeito do calor sob uma amostra, associando este a uma alteração física ou química. As transições de fase (fusão ebulição, sublimação, congelamento) ou reações de desidratação, decomposição, óxido-redução são causadas pelas variações de calor. Normalmente transições de fase produzem efeitos endotérmicos, já cristalizações, oxidações e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (IONASHIRO, 2004).

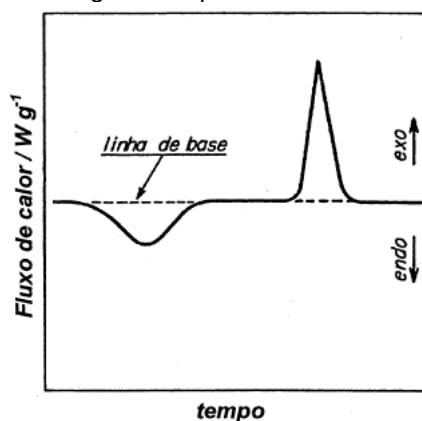
3.3.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Nessa técnica termoanalítica as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte enquanto ambas são submetidas a uma programação controlada de temperatura. O registro

da variação da temperatura (aquecimento e resfriamento) compõem a curva DSC (DENARI; CAVALHEIRO, 2012; IONASHIRO, 2004).

Ionashiro (2004) sugere que essa técnica permite estudar os efeitos de calor junto a alterações físicas ou químicas da amostra, capazes de causar variações de calor, como: fusão, ebulição, sublimação, desidratação, decomposição, entre outros. É possível estudar também as transições vítreas, cristalinas, em reações exotérmicas ou endotérmicas. Na Figura 7 estão exemplificadas as curvas exotérmicas ou endotérmicas possíveis de serem observadas na análise de DSC.

FIGURA 7 - Curva genérica para a análise de DSC ou DTA.



Fonte: Adaptado de BERNAL et al. (2002).

Como exemplos de variação de entalpia de forma exotérmica tem-se a transição cristalina, adsorção, degradação oxidativa, polimerização, combustão, entre outros. Já para a variação de entalpia na forma endotérmica tem-se: fusão, vaporização, transição vítrea, desidratação e o fenômeno de gelatinização (BERNAL et al., 2002).

3.3.3. PROPRIEDADES DE PASTA (RVA)

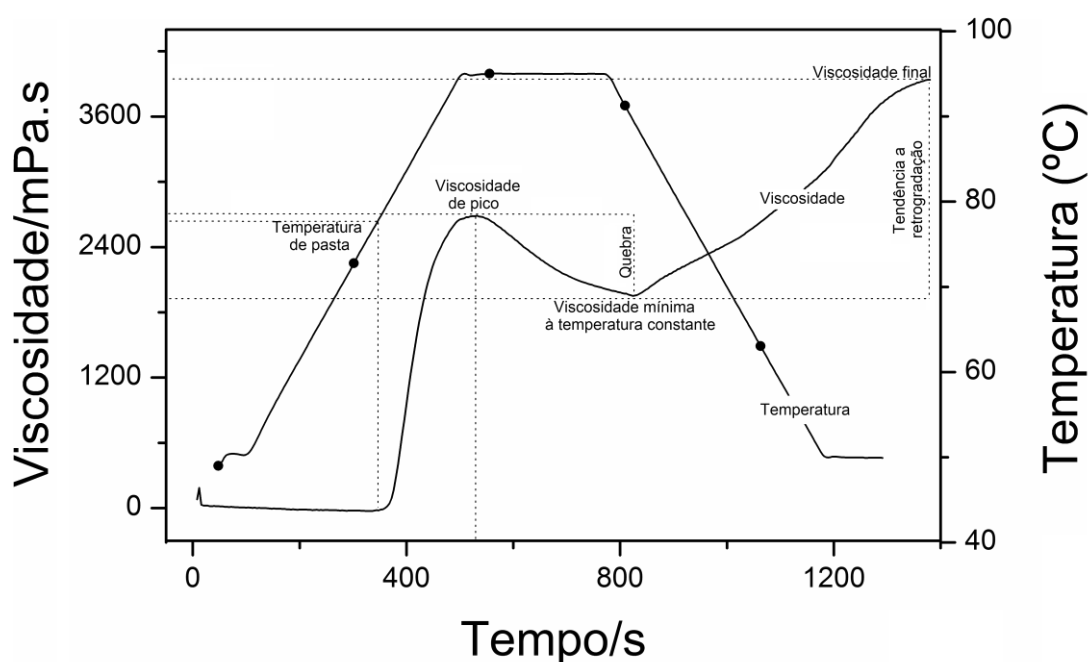
Suspensões amiláceas apresentam mudanças em sua viscosidade durante o aquecimento, pois acontece o intumescimento dos grânulos de amido. Essas variações de viscosidade são comumente avaliadas em viscosímetros rotacionais especiais denominados de viscoamilógrafos, os mais comumente utilizados são os da marca Brabender (Duisburg, Alemanha) e o Rápido Viscoanalisador (RVA), fabricado pela Newport Scientific (Warriewood, Austrália) (ZORTÉA et al., 2011).

Em diversos países o Rápido Viscoanalisador, um viscosímetro rotacional, é largamente utilizado para se avaliar a qualidade de amidos e farinhas. As propriedades de pasta de amidos obtidos pelo RVA incluem pico de viscosidade, tempo para atingir esse pico, quebra, viscosidade final e temperatura de pasta (ZORTÉA et al., 2011).

Os parâmetros normalmente fornecidos pelo RVA quando se analisa as propriedades de pasta através da curva de empastamento (Figura 8) são (ORO et al., 2013):

- Temperatura de pasta: temperatura em °C, calculada com base no tempo de funcionamento do RVA ($6\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$); correspondente ao ponto onde se inicia a formação da curva;
- Viscosidade de pico: valor de máxima viscosidade do amido, durante o ciclo de aquecimento;
- Quebra: diferença de viscosidade entre o pico máximo e a viscosidade mínima a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Viscosidade Final: valor da viscosidade à temperatura final de resfriamento;
- Retrogradação: diferença de viscosidade mínima a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a viscosidade final, também chamado de *setback*.

FIGURA 8 - Curva típica obtida em análise no RVA, apresentando os parâmetros quantificados para propriedade de pasta.



Fonte: A autora.

3.3.4. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A presença e as características da estrutura cristalina dos grânulos de amido são identificadas e reveladas através da técnica de difratometria de raios X (SINGH et al., 2003).

Essa técnica quando aplicada a amidos permite a determinação matemática da porção cristalina do polímero, que comumente reemite a radiação em uma faixa de 5 ° a 50 ° (2θ) (BENINCA, 2012a; BENINCA, 2012b; ZHANG et al., 2009).

A difratometria de raios X possui inúmeras vantagens quanto à caracterização de fases, mas podemos destacar dentre elas, a simplicidade do método, rapidez e a confiabilidade dos resultados obtidos, afinal o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina (ALBERS et al., 2002).

O amido nativo pode ser classificado em 3 tipos diferentes de estruturas cristalinas a partir das diferenças dos difratogramas de raios X: amidos de cereais como tipo “A”, amidos de tubérculos como tipo “B” e amidos de vagens como tipo “C”, uma mistura de “A” e “B”. Quando as moléculas de amilose associam-se à lipídeos no grânulo de amido, é visualizado um padrão de Raios X tipo V, que é parcialmente resistente à digestão enzimática (CORRADINI et al., 2005; LOBO; SILVA, 2003).

Para o amido o grau de cristalinidade relativa pode ser calculado pela seguinte equação (ADAMOVICZ et al., 2015):

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

Onde: Xc é a cristalinidade relativa, Ap é referente a área de pico e Ab é referente a área da base.

3.3.5. MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento muito versátil e utilizado frequentemente em análises micro estruturais de materiais sólidos. Apesar do mecanismo para a obtenção da imagem ser complexo, a sua interpretação é realizada facilmente (MUCCILLO, 2009).

Para análises em amido, por meio do MEV é possível caracterizar o tamanho e a forma dos grânulos. O tamanho dos grânulos pode variar de 2 a 100µm e diversas formas (oval, elipsoide, tetraédrica, entre outras) podem ser encontradas, variando da fonte amilácea analisada, pois tanto a forma quanto o tamanho é diferente para cada origem botânica (MUCCILLO, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Foi utilizado o amido de pinhão extraído em laboratório a partir de pinhões comprados na região de Ponta Grossa/PR, no mês de maio do ano de 2014.

O complexo enzimático utilizado foi o Distillase® SSF, da empresa Genencor® (Danisco US Inc.) composto por: α - Amilase (1,4- α -D-glucanglucanohidrolase), amiloglucosidase (1,4- α -D-glucan hidrolase) e a Aspergillopepsin 1.

Todas as análises necessárias foram realizadas nos laboratórios do Centro de Tecnologia Agroalimentar – CTA da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. EXTRAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO

O amido de pinhão foi obtido a partir de sementes sadias, descascadas e secas. As sementes foram trituradas no moinho IKA Werke M20, e a partir da farinha bruta obtida, fez-se uma suspensão com a adição de água destilada, na proporção de 1:5 (farinha:água destilada), a qual foi mantida sob agitação constante (900 rpm) por 10 minutos. Após este passo, a amostra foi passada através de peneiras de 150 e 270 mesh, respectivamente. Após 1 hora de repouso descartou-se o sobrenadante e a suspensão de amido retida no fundo do recipiente foi centrifugada a 9.500 rpm durante 5 min (Rotina420R, Hettich Zentrifugen). Descartou-se a camada superficial para eliminação de proteínas e outros componentes aderidos ao amido. A camada inferior, referente ao amido, foi recuperada e seca em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 24 h. A amostra foi mantida em dessecador com cloreto de cálcio anidro até massa constante.

4.2.2. MODIFICAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO POR AÇÃO ENZIMÁTICA

O complexo enzimático utilizado foi Distillase ® SSF, da empresa Genencor® (Danisco US Inc.), composto por: α - Amilase (1,4- α -D-glucanglucanohidrolase), amiloglucosidase (1,4- α -D-glucan hidrolase) e a Aspergillopepsin 1.

Os amidos foram tratados sendo dispersos em uma solução tampão acetato de pH 5,0 e adicionado 0,07 g de complexo enzimático por 100 g de amido. Essa dispersão foi mantida sobre agitação constante e aquecimento de 31 °C (temperatura ótima para a enzima pela informação do fabricante) durante os tempos de 12 h, 24 h e 36 h.

Após a hidrólise enzimática os amidos foram lavados com 500mL de água destilada e filtrados em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo, secos em estufa a 40 °C por 24 h e mantidos em dessecador até massa constante.

4.2.3. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS AMIDOS DE PINHÃO

Realizou-se a composição centesimal dos amidos nativo e modificados enzimaticamente. Após secagem dos amidos, a composição centesimal foi determinada segundo a metodologia proposta pela AOAC (2011). Foram determinados os teores de proteína, lipídeos, cinzas e fibra alimentar através dos protocolos 960.52, 920.39C, 923.03 e 962.09E respectivamente.

A quantificação da umidade foi feita por infravermelho, em Analisador de umidade MA150, da marca Sartorius (Alemanha), com a amostra espalhada sob o recipiente de alumínio, sendo mantida 105°C por 15 minutos.

Os carboidratos foram determinados por diferença, com os valores obtidos dos outros componentes.

4.2.4. TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

Inicialmente o equipamento de análise térmica TGA-60 (Shimadzu, Japão) foi calibrado com oxalato de cálcio mono-hidratado.

Foram pesadas aproximadamente 7-10 mg de amostra em microcadinhos de α -alumina na balança do equipamento previamente tarada. A análise foi realizada

com os seguintes parâmetros: aquecimento de 30 °C a 600 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob um fluxo de ar sintético a uma vazão de 50 mL min⁻¹.

Para a remoção de impurezas, os cadinhos de α -Al₂O₃ utilizados na TG foram mergulhados em ácido nítrico e posteriormente levados à chama oxidante do bico de Bunsen até a completa decomposição da matéria orgânica que poderia restar no cadinho.

O programa utilizado para obtenção dos valores das curvas foi o TGA-60-Shimadzu (Japão), enquanto que para a compilação das curvas utilizou-se o software Origin 6.1.

4.2.5. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas DSC foram feitas no equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA).

A massa das amostras foi de aproximadamente 2,5 mg, adicionando-se, com o auxílio de uma micropipeta, 10 µL de água, para que a proporção fosse 1:4 (amido:água). Os cadinhos de alumínio usados foram selados para se observar o fenômeno de gelatinização. A suspensão ficou em repouso por 1 h para equilibrar a umidade e ocorrer o entumescimento dos grânulos.

As condições do equipamento propostas para a análise foram: razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até alcançar a temperatura de 100 °C, com fluxo de ar de 50 mL min⁻¹. O equipamento utilizado foi previamente calibrado com um padrão de índio 99,99 % (Ponto de fusão = 156,4 °C e ΔH_{fus} = 28,50 J g⁻¹). Para a compilação das curvas utilizou-se o software Origin 6.1.

4.2.6. PROPRIEDADES DE PASTA (RVA)

Inicialmente a amostra teve a umidade previamente aferida em balança de infravermelho (Sartorius, Alemanha). Este valor de umidade foi utilizado para correção da massa de amido. Após esse procedimento, baseado na instrução de funcionamento do equipamento RVA, pesou-se 2,24g de amido em base seca, completando para 28 g com água destilada.

A suspensão preparada foi submetida a uma agitação rotacional de 160 rpm e aquecimento contínuo de 50 a 95 °C a uma taxa de 6 °C min⁻¹. A temperatura foi mantida a 95 °C durante 5 min, e então resfriada até 50 °C novamente. Todo o processo teve uma duração de 23 minutos. O software utilizado para obtenção dos dados e das curvas foi o Thermocline for Windows (TCW).

4.2.7. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

As amostras foram analisadas no Difrátômetro de raios X Ultima 4 (Rigaku, Japão) do Complexo de Laboratórios Multiusuário (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Cada amostra foi depositada sobre um suporte de vidro próprio do equipamento e exposta a radiação CuK α (comprimento de onda de 1.541 Å) submetidas a 40 kV e corrente de 30 mA.

A radiação dispersa foi detectada na faixa angular de 5-50 ° (2 Θ), com velocidade de digitalização (tempo de varredura) de 2 ° min⁻¹ e uma etapa de 0.02 °.

4.2.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no equipamento VEGA3 do fabricante TESCAN (República Tcheca). Os parâmetros da análise foram: 20 μ m de escala de leitura, com 15-20 kV de tensão no feixe de elétrons, filamento de tungstênio e detector de elétrons retro-espelhado.

O equipamento se baseia na passagem de elétrons através da amostra, previamente preparada. Inicialmente a amostra foi fixada em uma fita adesiva de carbono e foi pulverizada com plasma de ouro e paládio. A leitura da imagem aconteceu a partir do detector de elétrons que registrou as imagens e as transmitiu ao computador acoplado ao equipamento.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram utilizados para comparar as médias amostrais com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O software utilizado foi o SASM-Agri 8.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS AMIDOS DE PINHÃO

Os resultados da análise centesimal das amostras de amido de pinhão e das amostras modificadas por 12, 24 e 36 h de tratamento enzimático estão dispostos na Tabela 4.

TABELA 4 - Composição centesimal das amostras de: amido de pinhão nativo (A), e modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).

Amostra	Composição centesimal (g 100g ⁻¹)					
	Umidade	Carboidratos	Proteína	Lipídeos	Fibra bruta	Cinzas
(A)	15,19 ± 0,49 ^a	83,22 ± 0,36 ^b	0,24 ± 0,02 ^a	0,49 ± 0,07 ^a	0,78 ± 0,14 ^a	0,08 ± 0,01 ^a
(B)	9,83 ± 0,76 ^b	89,01 ± 0,92 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,49 ± 0,07 ^a	0,40 ± 0,25 ^a	0,05 ± 0,01 ^b
(C)	10,12 ± 0,49 ^b	88,74 ± 0,45 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,07 ^a	0,39 ± 0,03 ^a	0,04 ± 0,01 ^b
(D)	10,32 ± 0,60 ^b	88,40 ± 0,52 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,06 ^a	0,56 ± 0,09 ^a	0,04 ± 0,01 ^b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Segundo Buléon et al. (1998), componentes como lipídios, proteínas, enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos muitas vezes são removidos pelos procedimentos de extração de amido. Assim sendo, um raciocínio semelhante pode ser feito para as quantidades reduzidas de proteínas e cinzas que foram obtidas no presente estudo, em comparação às quantias encontradas nas sementes cruas de pinhão relatado por Cordenunsi et al. (2004) e Cladera-Olivera et al. (2011), que obtiveram aproximadamente 6,5 g 100g⁻¹ de proteína e 3,0 g 100g⁻¹ de cinzas.

A quantidade de cinzas condiz com o encontrado por Bello-Pérez et al. (2006) de 0,04 g 100 g⁻¹. Já o conteúdo de proteínas e lipídeos corroboram com os encontrados por Gonçalves et al. (2014) e o de carboidratos apresenta valores muito próximos para o amido de pinhão nativo, onde o autor obteve 78,09 ± 0,26 g 100 g⁻¹. Entretanto para as amostras modificadas (B-D) por tratamento enzimático, pode-se observar um aumento do conteúdo de carboidratos, apesar de se esperar uma diminuição no teor do mesmo, uma vez que o amido sujeito a hidrólise gera unidades menores, que não são retidas no filtro e também podem ser solubilizadas em água (SŁOMIŃSKA; ZIELONKA; JAROSŁAWSKI, 2013).

Sugere-se então que o aumento no conteúdo de carboidratos aconteceu devido à ação enzimática que promoveu a hidrólise do amido em componentes menores (maltose, glicose e outros), os quais receberam uma molécula de água (18

g mol⁻¹). A retenção desses compostos na estrutura do amido, conforme apresentado no trabalho de Ribeiro et al. (2014), onde o amido se complexou com diferentes açúcares, como a glicose, aumentou o teor de carboidratos.

5.2. TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

A Tabela 5 mostra os resultados TG/DTA para o amido de pinhão nativo e as amostras que passaram por modificação enzimática. As perdas de massa das amostras durante a degradação térmica ocorreram em três etapas. A primeira perda de massa é referente à vaporização de compostos voláteis, especialmente moléculas de água adsorvidas nos grânulos de amido, podendo-se considerar o valor desta 1ª perda correspondente à umidade presente nas amostras (DI-MEDEIROS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). A umidade das amostras, obtida pelo TG, foi respectivamente: (A) 8,58%, (B) 8,25%, (C) 7,59% e (D) 8,38%.

A segunda perda de massa, após a estabilidade e/ou platô, corresponde à decomposição da cadeia principal de carbono. Nesta etapa ocorre uma acentuada perda de massa, o que indica a presença de grandes quantidades de compostos com propriedades térmicas semelhantes, comportamento característico dos homopolissacarídeos, grupo no qual está inserido o amido. Na faixa de temperatura de 300-350 °C ocorre a principal etapa de decomposição do amido, que consiste de uma rápida desidratação e decomposição dos grupos hidroxila dos resíduos de glucose para formar moléculas de água (DI-MEDEIROS et al., 2014).

Em geral, a segunda e a terceira perdas de massa, que ocorreram de forma consecutiva, são atribuídas à decomposição e oxidação da matéria orgânica até a formação das cinzas, as quais totalizaram 3,33 % para a amostra nativa e de 2,10 %, 2,19 %, e 0,93 % para as amostras tratadas, respectivamente.

TABELA 5 - Resultados TG/DTA das amostras de: amido de pinhão nativo (A), e amido de pinhão modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).

Amostra	Resultados TG e DTA			
	Etapa	$\Delta m/\%$	$\Delta T/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$
(A)	1 ^a	8,58	30-140	70,90 (endo)
	Estabilidade	-	140-219	-
	2 ^a	69,07	219-391	300,62 (endo)
				351,55 (exo)
	3 ^a	19,02	391-549	500,81 (exo)
(B)	1 ^a	8,25	30-138	73,10 (endo)
	Estabilidade	-	138-216	-
	2 ^a	72,32	216-418	280,42 (endo)
				327,01 (exo)
				348,90 (exo)
(C)	3 ^a	17,33	418-561	499,55 (exo)
	1 ^a	7,59	30-145	73,42 (endo)
	Estabilidade	-	145-233	-
	2 ^a	72,41	233-411	295,23 (endo)
				324,95 (exo)
(D)				351,18 (exo)
	3 ^a	17,81	411-560	495,97 (exo)
	1 ^a	8,38	30-146	72,79 (endo)
	Estabilidade	-	146-232	-
	2 ^a	72,33	232-408	300,15 (endo)
				352,24 (exo)
	3 ^a	18,36	408-571	500,18 (exo)

Δm , perda de massa (%); ΔT , diferença de temperatura ($^\circ\text{C}$); T_p , temperatura de pico ($^\circ\text{C}$).

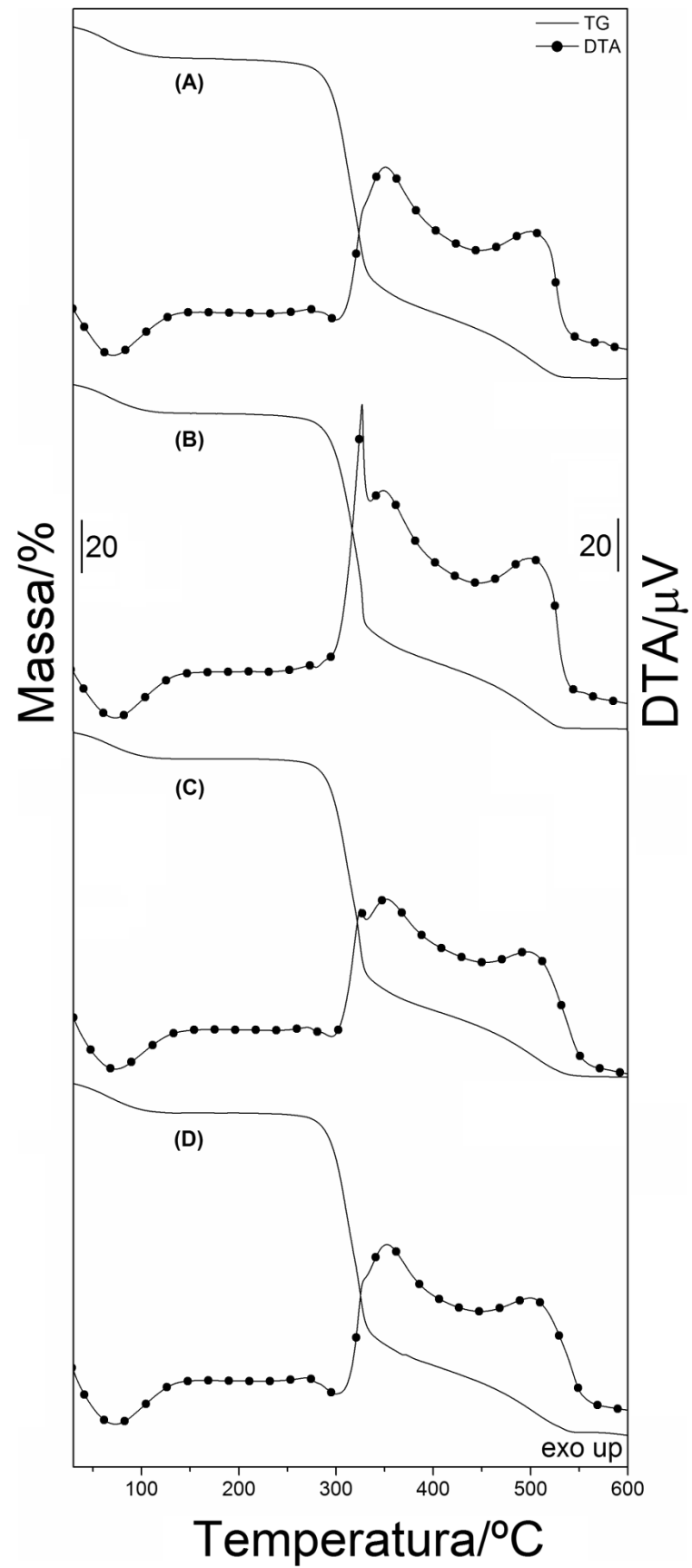
As amostras modificadas (B, C e D) demonstraram semelhança entre si, diferenciando-se do nativo pelas maiores temperaturas de conclusão e aumento da perda de massa na segunda etapa. A estabilidade frente à degradação térmica, das amostras modificadas C e D, foram ampliadas com o tratamento enzimático, por iniciarem a 2^a perda de massa, que corresponde a degradação da matéria orgânica, em uma temperatura mais elevada, assim como em outros estudos, onde o amido de mandioca foi modificado com solução de 0,2 mol L⁻¹ de NaClO por 1 hora de exposição a luz ultravioleta ($\lambda=256$ nm) (HORNUNG et al., 2015).

A ação da enzima na amostra por 36 horas (amostra D) provocou o maior aumento na temperatura final da 3ª perda, sendo que, as amostras B e C não diferiram entre si nesse parâmetro, apesar de aumentarem em relação a amostra de amido nativa (A). No presente estudo verificou-se o aumento da temperatura final da segunda perda de massa para as amostras modificadas, uma vez que a ação da enzima gera produtos com menor massa molecular, que são mais estáveis termicamente (LACERDA et al., 2008).

O perfil encontrado nas curvas TG foi semelhante a outros amidos estudados, como amido de pinhão com adição de açúcares (RIBEIRO et al., 2014), amido de sementes de *M. jalapa* (RAMOS et al., 2015), amido de batata com inulina (KRYSTYJAN et al., 2015) e amido de mandioca pós termo-oxidação (JANKOVIĆ, 2013).

Na Figura 9, além das curvas TG, é possível observar as curvas DTA. Pode-se observar um pico endotérmico para todas as amostras, durante a 1ª perda de massa, pois ocorre um processo de absorção de calor para promoção da desidratação da amostra. No segundo evento de perda de massa observou-se um pequeno pico endotérmico em todas as amostras, seguido de outros picos exotérmicos, onde a amostra está emanando calor, por meio da ocorrência da degradação, carbonização e oxidação da matéria orgânica, o que ocorre também durante a 3ª perda com um pico exotérmico. Comportamento semelhante foi obtido por Beninca et al. (2008) para o amido de milho modificado com tratamento ácido.

FIGURA 9 - Curvas TG-DTA das amostras: amido de pinhão nativo (A) e as modificadas enzimaticamente por 12 h (B), 24h (C) e 36h (D)



5.3. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas das diferentes amostras de amido pinhão (nativa e modificadas) foram registradas a fim de se caracterizar o processo de gelatinização e seus parâmetros específicos. A gelatinização ocorre quando os grânulos de amido passam por um aquecimento em presença de água, passando de uma fase ordenada para uma desordenada, formando um gel (GOÑI et al., 2008; BOGRACHEVA et al., 2002).

Os valores dos parâmetros analisados (T_o , T_p , T_c , ΔH) das curvas obtidas nesse estudo para o amido de pinhão nativo e tratado enzimaticamente, foram maiores que os encontrados por Costa et al. (2013) que caracterizou quatro variedades diferentes de amido de pinhão. Mas sabe-se que a semente de pinhão varia suas características conforme a origem da amostra analisada. Todas as amostras apresentaram valores muito próximos de T_o e T_p , como é possível observar na Tabela 5. Na literatura são encontrados valores de $62,44 \pm 0,02$ °C de T_p para amido de pinhão da região de Ponta Grossa - PR (RIBEIRO et al., 2014).

TABELA 6 - Resultados de DSC para as amostras A, B, C e D.

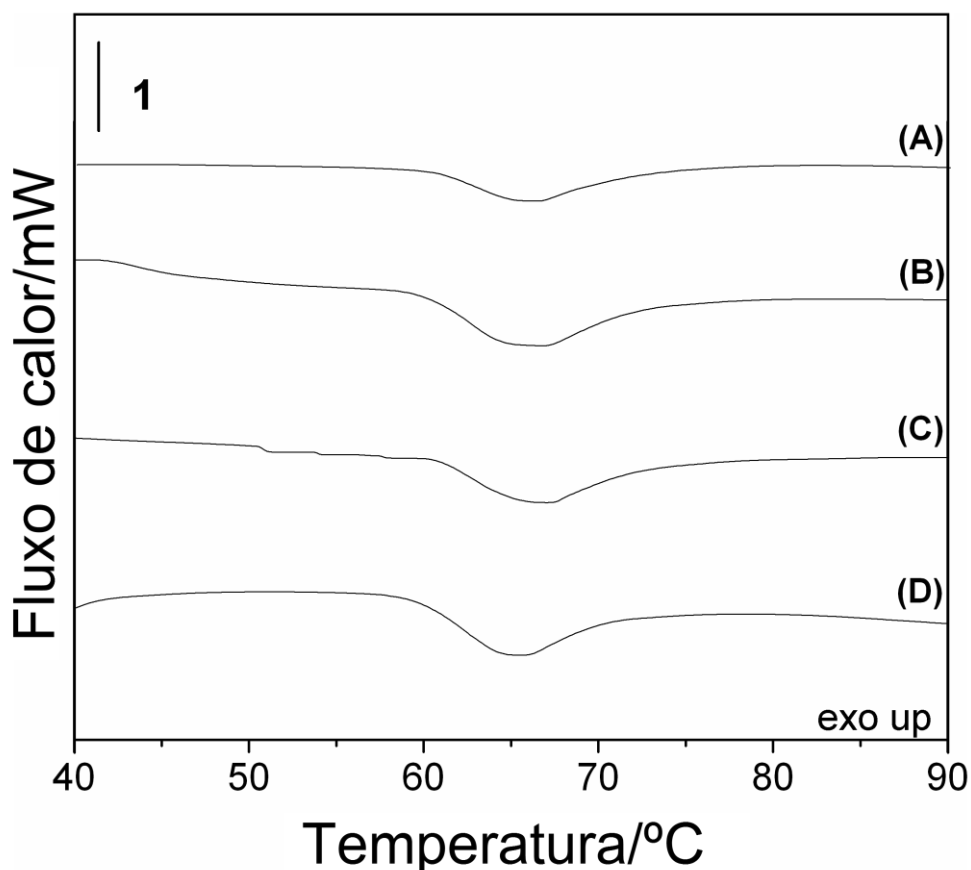
Amostra	DSC gelatinização			
	T_o /°C	T_p /°C	T_c /°C	ΔH_{gel} /J g ⁻¹
(A)	60,00±0,04 ^b	66,26±0,01 ^a	71,49±0,08 ^a	10,63±0,18 ^b
(B)	59,95±0,19 ^b	66,16±0,63 ^a	70,47±2,78 ^a	12,05±0,21 ^a
(C)	60,84±0,05 ^a	67,02±0,01 ^a	71,94±0,07 ^a	9,33±0,18 ^d
(D)	59,76±0,17 ^b	65,01±0,02 ^b	66,23±0,01 ^b	9,93±0,09 ^c

(*) T_o "onset" temperatura inicial, T_p temperatura de pico, T_c temperatura de conclusão, ΔH_{gel} entalpia de gelatinização. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para os valores de ΔH , a amostra B, que passou pelo menor tratamento enzimático (12 horas), apresentou a maior entalpia de gelatinização, já as amostras que passaram por um maior tempo de hidrólise, tiveram suas entalpias diminuídas. Em outros trabalhos, observa-se esse comportamento, da amostra com a maior modificação, ter uma menor entalpia em relação a nativa, como nos trabalhos: amido de batata doce e mandioca nativos e tratados termicamente (MU et al., 2013), amidos de *Zea mays* L., *Fritillaria ussuriensis* Maxim. e *Dioscorea opposita* Thunb.

nativos e hidrolizados por ação enzimática (JIANG et al., 2011). Segundo Jiang et al. (2011) a redução na ΔH_{gel} ocorre pela hidrólise das estruturas cristalinas e helicoidais do amido.

FIGURA 10 - Curvas DSC de: amido de pinhão nativo (A) e os modificados por ação enzimática (B, C e D)



Na Figura 10, pode-se observar as curvas de gelatinização do amido, que iniciaram entre 59-61 °C e concluíram de 66 a 72 °C. Todas as curvas apresentaram pico endotérmico característico da curva de gelatinização.

5.4. PROPRIEDADE DE PASTA (RVA)

Pelos valores obtidos no RVA observou-se uma diminuição nos valores de viscosidade de pico e viscosidade final, além de um aumento no valor do tempo do pico para as amostras modificadas, que pode ser observado na Tabela 3. A tendência de retrogradação (*Setback*) diminuiu após o tratamento enzimático das

amostras, sendo que os valores obtidos apresentaram-se próximos entre as amostras modificadas (de 1751 a 1775 mPa s). As amostras tratadas apresentaram valores de quebra e viscosidade final menores em relação ao nativo.

TABELA 7 - Resultados RVA das amostras: amido de pinhão nativo (A), e amido de pinhão modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).

Amostra	Temperatura de Pasta/°C	Viscosidade de Pico/mPa s	Tempo do Pico/s	Tendência a Retrogradação/ mPa s	Quebra/mPa s	Viscosidade Final/ mPa s
(A)	66,73±0,04 ^c	3204,08±0,11 ^a	379,90±0,14 ^c	1867,50±0,71 ^a	1686,08±0,11 ^a	3385,50±0,71 ^a
(B)	67,05±0,01 ^b	2795,50±0,71 ^d	436,10±0,14 ^b	1775,00±1,41 ^b	1496,50±0,71 ^c	3074,00±1,41 ^c
(C)	67,16±0,01 ^a	2867,50±2,12 ^b	440,40±0,85 ^a	1756,50±2,12 ^c	1527,50±2,12 ^b	3096,50±2,12 ^b
(D)	66,38±0,04 ^d	2848,50±0,71 ^c	435,35±1,20 ^b	1751,25±0,35 ^c	1533,50±0,71 ^b	3066,25±0,35 ^d

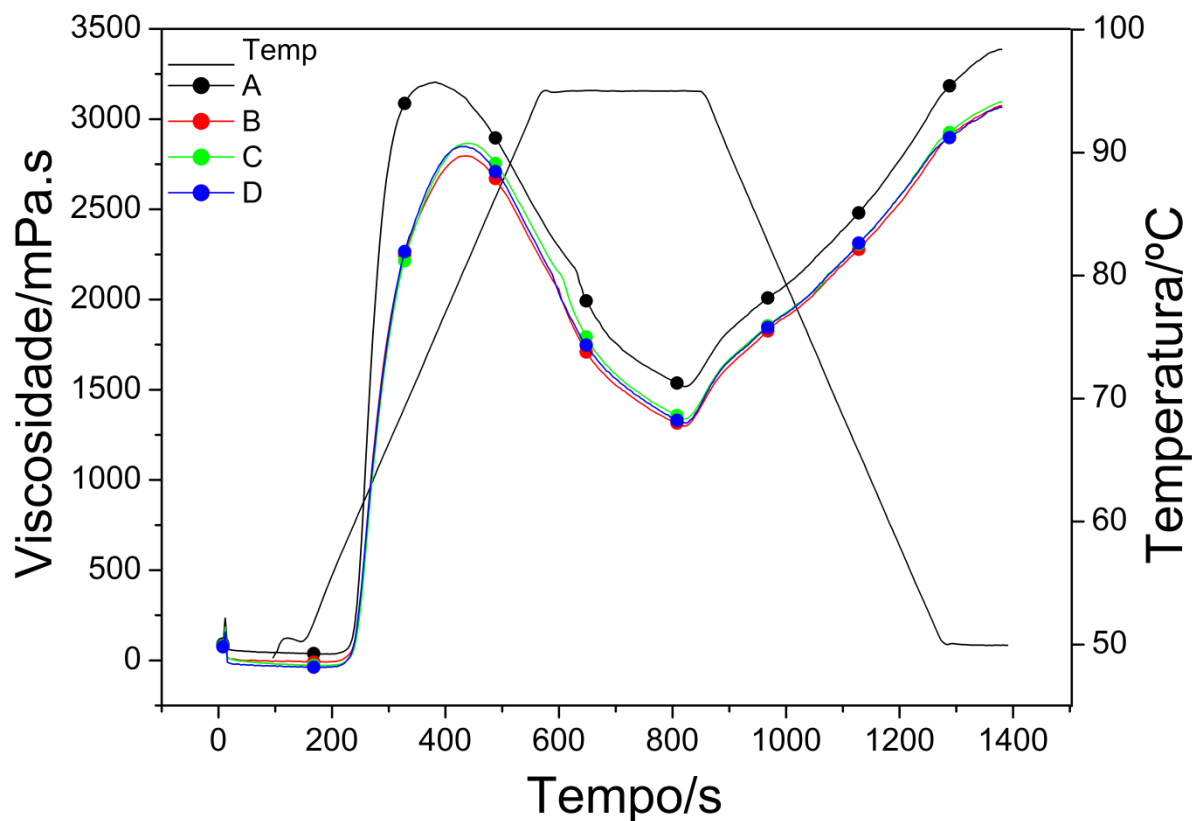
(*)mPa s “milipascal segundo”, s “segundo”. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em relação aos valores de temperatura de pasta, Ribeiro et al. (2014) obtiveram valores semelhantes para o amido de pinhão, já Klein et al. (2013) obtiveram temperaturas menores, de aproximadamente 64 °C e Stahl et al. (2007) de 59,6 °C.

As amostras modificadas tiveram a tendência a retrogradação diminuída pela ação da enzima, sendo uma propriedade reológica de grande interesse para a indústria de alimentos, pois para processos industriais espera-se um menor valor de retrogradação (MAIA et al., 1999).

Os perfis reológicos das amostras nativa e pós-tratamento enzimático estão representados na Figura 11. Perfis semelhantes a estes foram encontrados para amidos nativos e modificados em outros trabalhos: amido de mandioca modificado com hidrocolóides (ALBERTON et al., 2014) e amido de mandioca modificado com ácido clorídrico (BENINCA et al., 2013).

FIGURA 11 - Curvas RVA para a amostra de amido de pinhão nativo (A) e os modificados por ação enzimática (B, C e D).



Oliveira et al. (2014) e Beninca et al. (2013) descrevem um comportamento reológico semelhante para amidos de milho ceroso e de mandioca tratados com ácido, em meio aquoso. E Ribeiro et al. (2014) obteve o mesmo comportamento para amostras de amido de pinhão, comprovando a eficácia e confiabilidade da análise de RVA na caracterização do comportamento reológico de pastas amiláceas.

5.5. DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X (DRX)

A comparação entre os padrões de difratograma de Raios X entre o amido de pinhão nativo (A) e os tratados com o complexo enzimático (B, C e D) é mostrado na Figura 12 e o grau de cristalinidade relativo é apresentado na Tabela 8.

Com os dados coletados, foi possível observar a diminuição da cristalinidade relativa em todas as amostras enzimaticamente tratadas, não havendo diferença significativa entre os tratamentos pelo Teste de Tukey a 5% de significância. A

redução da cristalinidade pode-se ser explicado pela ação da enzima sobre as cadeias de amilopectina, que constituem a fase cristalina do amido (CORRADINI et al., 2005). Sendo assim possível afirmar a ação da enzima sobre a amilopectina do amido de pinhão, pois a cristalinidade das amostras diminuíram após o tratamento enzimático. Pinto et al. (2015) obtiveram um maior valor de cristalinidade relativa para o amido de pinhão nativo, de aproximadamente 27,2%, com a diminuição com os tratamentos de calor e baixa umidade aplicados pelo autor, assim como neste estudo que diminuiu com a modificação enzimática.

TABELA 8 - Grau de cristalinidade relativa para as amostras de: amido de pinhão nativo (A) e os modificados com o complexo enzimático (B, C e D).

Amostra	Grau de cristalinidade relativa (%)
(A)	22,58±0,35 ^a
(B)	16,99±0,18 ^b
(C)	17,22±0,25 ^b
(D)	17,66±0,65 ^b

O grau de cristalinidade relativa foi calculado em porcentagem, os picos foram determinados em 2θ . Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os padrões dos difratogramas das amostras mantiveram-se do tipo “C”. Esse padrão apresenta características intermediárias do tipo “A” e “B” (DAUDT et al., 2014). Ou seja, amido com o perfil do tipo C (encontrado em rizomas e sementes de leguminosas), é uma mistura do tipo A (cereais normais e cerosos) e B (tubérculos e alguns cereais de alto teor de amilose) e é mais complexo do que estes outros perfis de amidos, pois podem compor o amido do tipo C em proporções diferentes, fornecendo a este propriedades únicas (CAI et al., 2014a; LIN et al., 2015).

Os valores obtidos para os picos da amostra de amido de pinhão nativo e as modificadas por ação enzimática, estão na Tabela 9.

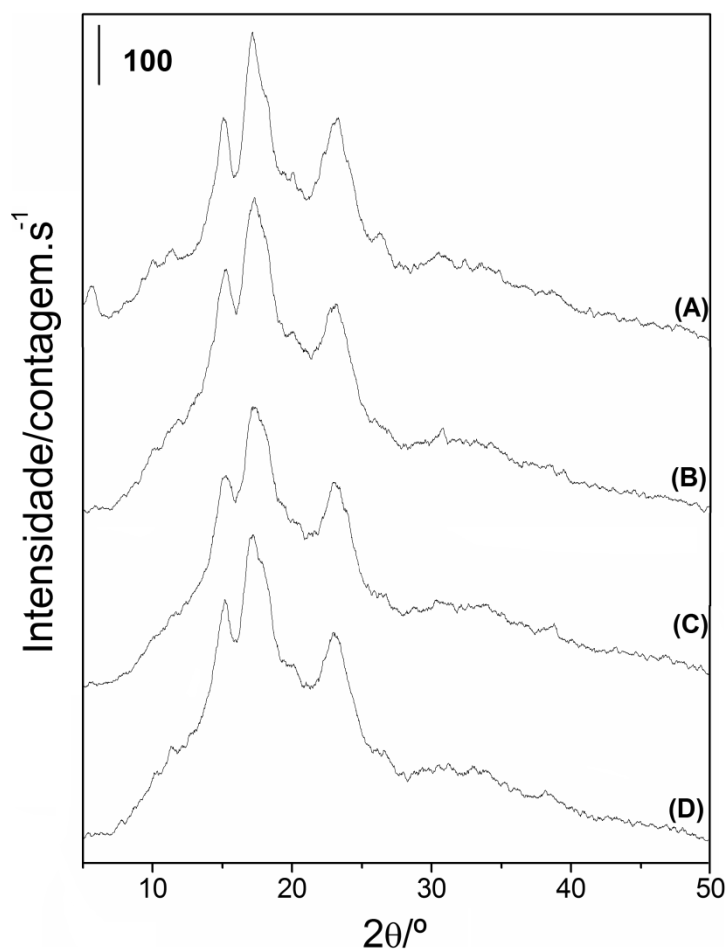
TABELA 9 - Picos obtidos por meio dos difratogramas de raios X para a amostra de amido de pinhão nativo e as modificadas por ação enzimática.

Amostra	Picos (°)			
(A)	5,66	15,08	17,16	23,32
(B)	-	15,28	17,32	23,17
(C)	-	15,26	17,34	23,00
(D)	-	15,26	17,12	22,96

* Os picos foram determinados em 2θ

Segundo Cai et al. (2014a) o difratograma típico de um amido do tipo C, mostra fortes picos de difração em cerca de 17° e 23° em 2θ e alguns pequenos picos a cerca de $5,6^\circ$ e 15° em 2θ . Pode-se perceber que os picos obtidos condizem ao encontrado em outros estudos, porém para as amostras modificadas, houve o desaparecimento do pico característico em $5,6^\circ$.

FIGURA 12 - Difratoformas de Raios X das amostras de: amido de pinhão nativo (A), e amido de pinhão modificado enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).



Na literatura foi encontrado um padrão de raios X do tipo “A” para amido de batata doce e mandioca tratados enzimaticamente (MU et al., 2013; SHARIFFA et al. 2009). Foi encontrado padrão do tipo “B” para amido de ervilha rugosa (ZHOU; HOOVER; LIU, 2004) e semelhante ao presente estudo, um padrão de raios X do tipo “C” quando os amidos de feijão preto, feijão “Pinto”, lentilha e ervilha lisa foram tratados enzimaticamente (ZHOU; HOOVER; LIU, 2004).

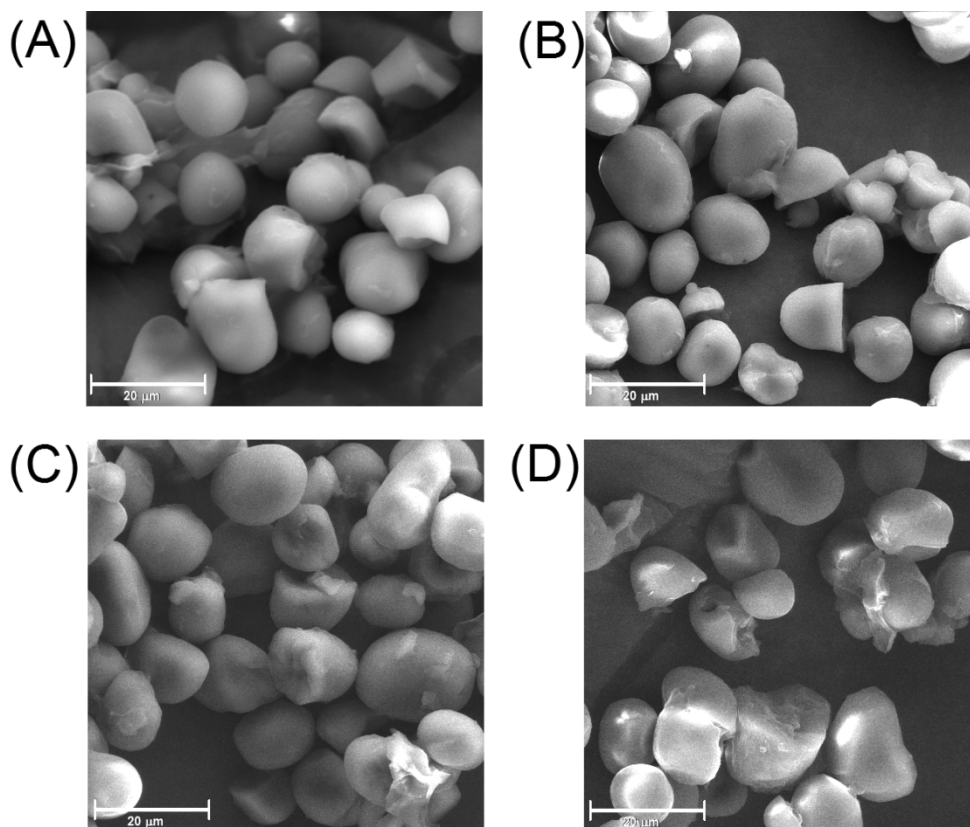
5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micro-imagens obtidas com um aumento de 2000x através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) estão representadas na Figura 13. Através delas foi possível observar a morfologia dos grânulos e obter os valores dos diâmetros médios das amostras, que foram respectivamente: (A) $12,42 \pm 2,46^a \mu\text{m}$, (B) $12,33 \pm 1,75^a \mu\text{m}$, (C) $14,42 \pm 3,07^a \mu\text{m}$ e (D) $13,98 \pm 3,31^a \mu\text{m}$. Não houve diferença significativa entre os diâmetros médios das amostras pelo Teste de Tukey a 5 % de significância.

Os valores apresentaram-se muito próximos aos obtidos por Ribeiro et al. (2014) que obteve o diâmetro médio de 14 μm para o amido de pinhão analisado, semelhante também ao amido de abacate, obtido por Lacerda et al. (2014).

O formato dos grânulos condiz ao encontrado por Gonçalves et al. (2014) e Costa de Conto et al. (2011), com forma arredondada e uma parte plana com irregularidades na superfície do grânulo.

FIGURA 13 – Micro-imagens obtidas no MEV (com a ampliação de 2.00kx) das amostras de amido de pinhão nativo (A), e as modificadas enzimaticamente por 12 h (B), 24 h (C) e 36 h (D).



Como descrito por Bello-Pérez et al. (2006) o amido de pinhão é uma mistura de grânulos esféricos e ovais, com tamanho entre 10 e 25 μm , características que podem ser observadas pelas micro-imagens das 4 amostras analisadas.

Conforme observado nas micro-imagens, a superfície dos grânulos não sofreu alteração aparente com a ação enzimática, assim como em ervilha lisa, feijão “Pinto” e feijão preto (KHATOON et al., 2009). Foi observada mudança na estrutura dos grânulos pós-tratamento enzimático em: amido de mandioca, batata doce (CHEN et al., 2011; MU et al., 2013; SHARIFFA et al., 2009), milho, arroz (KHATOON et al., 2009) e de forma mais intensa em amido de milho, com perfurações em sua estrutura (SZYMANOWSKA-POWALOWSKA et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

Com a composição centesimal foi possível quantificar cada componente do amido de pinhão nativo e verificar as alterações após a modificação.

Para os resultados de TG, observou-se que uma hidrólise enzimática mais intensa resultou no aumento da temperatura final para cada perda de massa, portanto a hidrólise elevou a estabilidade térmica das amostras modificadas.

Na análise de DSC observou-se que os parâmetros T_o , T_p , T_c não apresentaram grande variação, já a ΔH_{gel} apresentou uma diminuição após a modificação enzimática.

A análise RVA mostrou uma semelhança nos perfis das curvas, com uma diminuição na viscosidade de pico e final, além de um aumento do valor de "tempo de pico". Houve uma diminuição na tendência de retrogradação em todas as amostras tratadas.

Por meio da análise DRX, observou-se uma redução na cristalinidade das amostras modificadas, e foi possível caracterizar o padrão do amido de pinhão como tipo C, condizendo com a literatura.

As micro-imagens (MEV) mostraram a estrutura e a superfície dos grânulos, favorecendo a obtenção dos diâmetros médios, concluindo-se que não houve nenhuma diminuição no diâmetro das amostras tratadas ou mudança significativa na aparência das mesmas.

Os resultados obtidos permitiram determinar as propriedades térmicas, estruturais e reológicas do amido de pinhão nativo e hidrolisado enzimaticamente, possibilitando a aplicação futura desse produto na indústria alimentícia, farmacêutica ou papeleira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOVICZ, J. A. L.; CORDOBA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; OLIVEIRA, C. S.; SCHNITZLER, E. Evaluation on thermal, rheological and structural properties on the mixture of potato starch and pectin. **Carpathian Journal of Food Science & Technology**, v. 7, n. 2, p. 45-52, 2015.
- ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, p. 34-37, 2002.
- ALBERTON, C.; COLMAN, T.A.D.; SOUZA, J.A.; OLIVEIRA, C.S.; ANDRADE, M.M.P.; SCHNITZLER, E. Thermal analysis, rheology, x-ray diffractometry and atomic force microscopy in the evaluation of binary mixtures of “starch-hydrocolloids”, **Journal Microbiology Biotechnology Food Science**, v. 3, p. 305-309, 2014.
- ALVES, G. S.; SAMPAIO, A. P. L.; ZAVOLSKI, C. A.; BRITO, V. H.; CEREDA, M. O.; NEVES, E. Material a base de amido de mandioca para manufatura de embalagem de alimentos. **Citino**, v. 2, n. 1, p. 16-24, 2012.
- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p.425-431, 2007.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. Ed. 18ª. Gaithersburg. 2005. Revisão 2011.
- BALDWIN, Paul M. Starch Granule-Associated Proteins and Polypeptides: A Review. **Starch-Stärke**, v. 53, n. 10, p. 475-503, 2001.
- BALL, S. G.; WAL, M. H. B. J.; VISSER, R. G. F. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. **Trends in Plant Science**, v. 3, p.462-467, 1998.
- BELLO-PÉREZ; L. A.; GARCÍA-SUÁREZ; F. J.; MÉNDEZ-MONTEALVO, G.; 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/Starke**, v. 58, p. 283-291, 2006.
- 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, **Thermochim. Acta**, v. 552, p. 65-69, 2013.
- BENINCA, C.; COLMAN, T. A. D.; LACERDA, L. G.; FILHO, M. A. S. C; DEMIATE, I. M.; BANNACH, G.; SCHNITZLER, E. Thermal, reological and structural behavior of cassava starch granules, natural and modified with sodium hypochlorite solutions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, p. 2217-2222, 2012a.

BENINCA, C.; COLMAN, T. A. D.; LACERDA, L. G.; FILHO, M. A. S. C.; 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, 2012b.

BENINCA, C.; I. M. DEMIATE; L. G. LACERDA; M. A. S. CARVALHO FILHO; M. IONASHIRO; E. SCHNITZLER. Thermal behavior of corn starch granules modified by acid treatment at 30 and 50°C. **Ecletica Química**, v. 33, n. 3, p. 13-18, 2008.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 69, p. 60-78, 1991.

BŁASZCZAK, W.; VALVERDE, S.; FORMAL, J.; AMAROWICZ, R.; LEWANDOWICZ, G.; BORKOWSKI, K. Changes in the microstructure of wheat, corn and potato starch granules during extraction of non-starch compounds with sodium dodecyl sulfate and mercaptoethanol. **Carbohydrate polymers**, v. 53, n. 1, p. 63-73, 2003.

BOGRACHEVA, T.Y.; WANG, Y.L.; WANG, T.L.; HEDLEY, C.L. Structural Studies of Starches with Different Water Contents. **Biopolymers**, v.64, p. 268-281, 2002.

BRUMM, P. J. Enzymatic production of dextrose. **Cereal Food World**, v.40, p. 804-807, 1998.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology & Biochemistry**, v. 38, p. 141-156, 2000.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALLS, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Biomacromolecules**, v. 85, p. 85-112, 1998.

CAI, C.; CAI, J.; MAN, J.; YANG, Y.; WANG, Z.; WEI, C. Allomorph distribution and granule structure of lotus rhizome C-type starch during gelatinization. **Food chemistry**, v. 142, p. 408-415, 2014a.

CAI, J.; CAI, C.; MAN, J.; ZHOU, W.; WEI, C. Structural and functional properties of C-type starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 289–300, 2014b.

CAPELLA, A. C. V.; PENTEADO, P. T. P. S.; BALBI, M. E. SEMENTE de *Araucaria Angustifolia*: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA. **B. CEPPA**, v. 27, n. 1, p. 135-142, 2009.

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 221 p. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas).

CHEN, Y., HUANG, S.; TANG, Z.; CHEN, X.; ZHANG, Z. Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α -amylase and glucoamylase. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 272-275, 2011.

CLADERA-OLIVEIRA, F.; PETTERMAN, A. C.; NOREÑA, C. P. Z.; WADA, K.; MARCZAK, L. D. F. Thermodynamics properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). **International Journal of Food Science & Technology**, v.43, n. 5, p. 900-907, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F.; MARCZAK, L. D. F.; NOREÑA, C. P. Z.; PETTERMANN, A. C. Modeling water adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 3, p. 826-843, 2011.

CORDENUNSI, B. R.; MENEZES, E. W.; GENOVESE, M. I.; COLLI, C. SOUZA, A. G.; LAJOLO, F. M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3412-3416, 2004.

CORDOBA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; COLMAN, T. A. D.; OLIVEIRA, C. S.; ANDRADE, M. M. P.; COSTA, F. J. O. G.; SCHNITZLER, E. Effect of hydrochloric acid in different concentrations and temperatures up to some properties of organic cassava starch. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 2, n. 1, p. 6-11, 2013.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Comparative studies of corn thermoplastic starches with different amylose content. **Polímeros**, v. 15, p. 268-273, 2005.

COSTA, F.J.O.G.; LEIVAS, C. L.; WASZCZYNSKYJ, N.; 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, 2013.

COSTA DE CONTO, L.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; JOY STEEL, C.; 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(4), p. 198-208, 2011.

DAUDT, R. M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; CLADERA-OLIVERA, F.; THYSC, 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, 2014.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p. 945-954, 2009.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. São Carlos: IQSC, 2012.

DI-MEDEIROS, M. C. B.; PASCOAL, A. M.; BATISTA, K. A.; BASSINELLO, P. Z.; LIÃO, L. M.; LELES, M. I. G.; FERNANDES, K. F. Rheological and biochemical properties of *Solanum lycocarpum* starch. **Carbohydrate polymers**, v. 104, p. 66-72, 2014.

EC-PDB. **EC 3.4.23.18 Aspergillopepsin I.** Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.4.23.18>. Acesso em: 15 jul. 2014.

EDUARDO, M. P. **Hidrólise enzimática de mandioca e puba para obtenção de xarope de maltose.** 2002. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, 2002.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas.** 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERREIRA, S. M.; CALIARI, M.; SOARES JÚNIOR, M. S.; BELEIA, A. D. P. Infant dairy-cereal mixture for the preparation of a gluten free cream using enzymatically modified rice flour. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1033-1040, 2014.

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, n. 1, p. 21-27, 2014.

GOÑI, O.; ESCRIBANO, M.I.; MERODIO, C. Gelatinization and retrogradation of native starch from cherimoya fruit during ripening, using differential scanning calorimetry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 303–310, 2008.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K., & CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HOOVER, R. The impact of heat–moisture treatment on molecular structures and properties of starches isolated from different botanical sources. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 9, 835–847, 2010.

HORNUNG, P. S., GRANZA, A. G., OLIVEIRA, C. S., LAZZAROTTO, M., SCHNITZLER, E. Study of the effects of ultraviolet light and sodium hypochlorite solutions on properties of cassava starch granules. **Food Biophysics**, v. 10, n. 3, p. 368-374, 2015.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial** São Paulo: Giz Editorial, 2004.

JANKOVIĆ, B. Thermal characterization and detailed kinetic analysis of Cassava starch thermo-oxidative degradation. **Carbohydrate polymers**, v. 95, p. 621-629, 2013.

JIANG, Q.; GAO, W.; LI, X.; ZHANG, J. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed *Zea mays* L., *Fritillaria ussuriensis* Maxim. and *Dioscorea opposita* Thunb. Starches. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 521-528, 2011.

KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; ROSA ZAVAREZE, E.; COLUSSI, R.; EVANGELHO, J. A.; DIAS, A.R.G. Effect of single and dual heat–moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhão starches. **Carbohydrate polymers**, v. 98, p. 1578-1584, 2013.

KHATOON, S.; SREERAMA, Y.N.; RAGHAVENDRA, D.; BHATTACHARYA, S.; BHAT, K.K. Properties of enzyme modified corn, rice and tapioca starches. **Food Res. Int.**, v. 42, p. 1426–1433, 2009.

KIM, B.S.; KIM, H.S.; YOO, S.H. Characterization of enzymatically modified rice and barley starches with amylosucrase at scale-up production. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 61-68, 2015.

KRYSTYJAN, M.; CIESIELSKI, W.; KHACHATRYAN, G.; SIKORA, M.; TOMASIK, P. Structure, rheological, textural and thermal properties of potato starch–Inulin gels. **LWT - Food Science Technology**, v. 60, p. 131-136, 2015.

LACERDA, L. G.; CARVALHO-FILHO, M.A.S.; DEMIATE, I. M.; BANNACH, G.; IONASHIRO, M.; SCHNITZLER, E. Thermal behaviour of corn starch granules under action of fungal α -amylase. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, p. 445–449, 2008.

LACERDA, L.G.; COLMAN, T.A.D.; BAUAB, T.; CARVALHO-FILHO, M.A.S.; DEMIATE, I.M.; VASCONCELOS, E.C.; SCHNITZLER, E. Thermal, structural and rheological properties of starch from avocado seeds (*Persea Americana*, Miller) modified with standard sodium hypochlorite solutions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.115, p.1893-1899, 2014.

LEMOES, C. M. Y; FUNCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. GLUCOAMILASE: Estrutura e termoestabilização. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 31 ed, 2003.

LIN, L.; CAI, C.; GILBERT, R. G.; LI, E.; WANG, J.; WEI, C. Relationships between amylopectin molecular structures and functional properties of different-sized fractions of normal and high-amylose maize starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 359-368, 2016.

LIN, L.; HUANG, J.; ZHAO, L.; WANG, J.; WANG, Z.; WEI, C. Effect of granule size on the properties of lotus rhizome C-type starch. **Carbohydrate Polymers**, 2015, dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.026.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Nutrição**, v.16, p. 219-226, 2003.

MAIA, L.H.; WANG, S.H.; ASCHERI, J.L.; CABRAL, L.C.; FERNANDES, M.S. Pasting viscosity, water absorption and water solubility index of dehydrated rice-soybean porridges. **Food Science and Technology**, v. 19, p. 391-396, 1999.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MALUCELLI, L. C.; LACERDA, L. G.; CARVALHO FILHO, M. A. S.; FERNÁNDEZ, D. E. R.; DEMIATE, I. M.; OLIVEIRA, C. S.; SCHNITZLER, E. Porous waxy maize starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n.1, p. 525-532, 2015.

MALUCELLI, L. C.; LEMOS, C. F.; FILHO, M. A. S. C.; DEMIATE, I. M., SCHNITZLER, E., LACERDA, L. G. Caracterização da hidrólise parcial enzimática de amido isolado de abacate utilizando técnicas termoanalíticas e microscopia. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 3, n. 3-4, p. 31 – 35, 2014.

MENDES, M. L. M.; BORA, P. S.; RIBEIRO, A. P. L. Propriedades morfológicas e funcionais e outras características da pasta do amido nativo e oxidado da amêndoa do caroço de manga (*Mangifera indica* L.), variedade Tommy Atkins. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, v. 71, p. 76-84, 2012.

MIGUEL, A. S. M.; MARTINS-MEYER, T. S.; FIGUEIREDO, E. V. C.; LOBO, B. W. P.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. **Food Industry**, p. 287-321, 2013.

MU, T.H.; ABEGUNDE, O.K.; SUN, H.N.; DENG, F.M.; ZHANG, M. Physicochemical characterization of enzymatically hydrolyzed heat treated granular starches. **Starch/Stärke**, v. 65, p. 893–901, 2013.

MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão mediante provas funcionais e térmicas**. 2009,156f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MUNHOZ, M.P.; WEBER, F.H.; CHANG, Y.K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 403-406, 2004.

MYERS, A. M.; MORELL, M. K.; JAMES, M. G.; BALL, S. G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v.122, p. 989-997, 2000.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 31, n. 3, p. 345-352, 2002.

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.

ORO, T.; LIMBERGER, V. M.; MIRANDA, M. Z.; RICHARDS, N. S. P. S.; GUTKOSKI, L. C.; FRANCISCO, A. Propriedades de pasta de mesclas de farinha integral com farinha refinada usadas na produção de pães. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p. 754-760, 2013.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. Berlim: Springer Us, 2005.

PASSOS, M. **Valorização biotecnológica do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca: produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous***. 2002. 150 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; DEON, V. G.; MOOMAND, K.; EL HALAL, S. L. M.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; LIM, L.; DIAS, A. R. G. Effects of single and dual physical modifications on pinhão starch. **Food chemistry**, v. 187, p. 98-105, 2015.

PUMACAHUA-RAMOS, A.; DEMIATE, I. M.; SCHNITZLER, E.; BEDIN, A.C.; ROMERO, J. T.; LOPES-FILHO, J. F. Morphological, thermal and physicochemical characteristics of small granules starch from *Mirabilis jalapa* L. **Thermochimica Acta**, v. 60, 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 and Calorimetry**, v. 117, p. 935-942, 2014.

SCIENCE. **Alpha Amylase.** Disponível em: <http://science.marshall.edu/murraye/alpha_amylase.htm>. Acesso em: 01 ago. 2014.

SEVERO, M. G.; MORAES, K.; RUIZ, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.2, p. 345-350, 2010.

SHARIFFA, Y.N.; KARIM, A.A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I.S.M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 434-440, 2009.

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.

SŁOMIŃSKA; L.; ZIELONKA, R.; JAROSŁAWSKI, L. The unconventional single stage hydrolysis of potato starch. **Polish Journal of Chemical Technology**, v.15, n. 3, p. 7 -14, 2013.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos Processos de Gelatinização e Extrusão de Amido de Milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 24-30, 2000.

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, 2012.

STAHL, J. A.; LOBATO, L. P.; BOCHI, V. C.; KUBOTA, E. H.; GUTKOSKI, L. C.; EMANUELLI, T. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*) starch phosphates. **Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie**, v. 40, p. 1206-1214, 2007.

SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, D.; LEWANDOWICZ, G.; BLASZCZAK, W.; SZWENGIEL, A. Structural changes of corn starch during fuel ethanol production from corn flour. **BioTechnologia – J. Biotech. Comput. Biol. Bionanotech.**, v. 3, p. 333-341, 2012.

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.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 748-753, 2009.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Characterization of pinhão starch. Part I: Extration and properties of pinhão starch. **Starch/Starke**, v.37, p. 224-227, 1984.

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.

ZHOU, Y.; HOOVER, R.; LIU, Q. Relationship between α -amylase degradation and the structure and physicochemical properties of legume starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 299–317, 2004.

ZOBEL, H.F. X-ray Analysis of Starch granules. In Whistler RL, Smith RJ, BeMiller JN editors. **Methods in carbohydrate chemistry**. Academic Press, New York, p. 109-113, 1964.

ZORTÉA, M. E. B.; DEMIATE, I. M.; PRAXEDES, M. A.; WOSIACKI, G. 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. 05, n. 01, p.326-335, 2011.