

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de  
Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**

TESE DE DOUTORADO

Roberta Cruz Silveira Thys Muccillo

Engenheira de Alimentos (UFRGS)  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

Porto Alegre  
Agosto de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

## **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**

Roberta Cruz Silveira Thys Muccillo

Tese de Doutorado apresentada como requisito  
parcial para obtenção de título de Doutora em  
Engenharia.

Área de Concentração: Fenômenos de  
Transporte e Operações Unitárias

Orientador:  
Prof<sup>a</sup>. Dr. Caciano Zapata Pelayo Noreña

Co-orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lígia Damasceno Ferreira Marczak

Porto Alegre  
Agosto de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por dar-me saúde para tornar a vida possível.

Ao meu marido, por garantir o funcionamento do dia a dia na minha ausência.

À minha filha, Sofia, razão do meu esforço diário.

À minha família, em especial à minha mãe Lavínia, que não me fez desistir em inúmeros momentos de dificuldade.

À minha avó Maria, que aos seus 90 anos é um exemplo de doação, bondade e sabedoria.

Ao professor orientador Dr. Caciano P.Z. Noreña e à professora Co-orientadora Dra. Lígia D.F. Marczak, pela orientação e conselhos valiosos.

À bolsista de Iniciação Científica Andréia Gomes Aires (PIBIC - Fapergs), que deu base à este trabalho.

Ao funcionário Roberval B. de Souza.

Ao professor colaborador Dr. Nilo Sérgio Medeiros.

À amiga Florência Cladera, que foi, para mim, uma orientadora constante.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton (Campinas – SP), por possibilitar a realização de algumas análises, e ao seu pesquisador Mateus Cardoso, por participar ativamente do início deste trabalho.

À Marcelo Mignoni (Laboratório de Reatividade e Catálise do Instituto de Química da UFRGS).

À Michelle, da empresa *Fastline*, pelo auxílio gratuito, nas análises de DSC.

À empresa Leperg Assessoria e Representações Ltda e a todos os colegas que contribuíram para a finalização deste trabalho.

## RESUMO

O pinhão é a semente comestível da *Araucaria angustifolia*, sendo consumido no sul e sudeste do Brasil principalmente na sua forma *in natura*. A falta de diversidade em relação ao seu consumo acarreta a sobra da safra e a sua utilização como ração animal, o que diminui o valor de comercialização do produto, prejudicando os ganhos econômicos do produto. A semente do pinhão é composta de 34% de amido e um conteúdo muito baixo de proteínas e lipídios, o que a torna favorável para a obtenção de amido, aditivo amplamente utilizado pela indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar uma nova fonte de amido a partir de semente de *Araucária angustifolia*, através de um estudo detalhado da metodologia de extração do amido de pinhão, das características físico-químicas, funcionais e reológicas do grânulo e de sua modificação estrutural. Primeiramente foi determinado um protocolo para a extração do amido e realizado o estudo do efeito do tratamento alcalino ( $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  e  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ ), em relação ao tratamento com água, na estrutura dos grânulos do amido extraídos. Para tanto foram feitas análises de fluorescência intrínseca, microscopia eletrônica de varredura e de força atômica e difractometria de raios X. A estrutura granular do amido de pinhão foi alterada significativamente quando as soluções alcalinas foram utilizadas durante a extração. O amido de pinhão apresentou estrutura do tipo C. Foram determinadas as características do grânulo de amido nativo, através de análises físico-químicas, MEV, microscopia ótica e sinerese, onde se verificou que o diâmetro médio dos grânulos de amido varia de 7 a 20  $\mu\text{m}$  e as formas geométricas variam entre a oval, a elipsóide truncada e a hemisférica. O amido de pinhão mostrou-se menos propenso à retrogradação, comparado ao amido de milho. Foram elaboradas as isotermas de adsorção do amido nativo às temperaturas de 10°, 20°, 30° e 40°C a partir do ajuste dos dados experimentais a diversos modelos de sorção, sendo os modelos de Peleg, seguidos pelos de Chung-Pfost e GAB os que tiveram os maiores coeficientes de correlação. A partir do modelo de GAB foram calculados os valores de umidade de monocamada, entalpia e entropia diferenciais de sorção. Foi realizado também um planejamento experimental a fim de estudar a reação de hidrólise do amido, através da influência das variáveis temperatura (30° a 44°C) e concentração de ácido clorídrico (1,2 a 3,2  $\text{mol.l}^{-1}$ ) no valor de dextrose equivalente (DE) e na capacidade de formação do gel e de sua termorreversibilidade. Foi observado que sob os maiores valores de temperatura e concentração de ácido empregados, o valor de DE foi maior. No tratamento que resultou no maior valor de DE (3,2  $\text{mol.l}^{-1}$  de HCl e 44°C) foi observada a formação de gel termorreversível, o que indicou a potencialidade do amido modificado como substituto de gordura e agente ligante, em alimentos. A funcionalidade do amido de pinhão foi verificada através das análises de formação, fusão e termorreversibilidade do gel, tendência à retrogradação, estabilidade ao congelamento e descongelamento, poder de inchamento, índice de solubilização, MEV, viscosidade de pasta e propriedades térmicas, como temperatura e entalpia de gelatinização. Os resultados indicaram que: somente os amidos modificados apresentam géis termorreversíveis; os amidos de pinhão nativo e modificados possuem menor tendência à retrogradação do que seus similares de milho; a modificação do amido reduziu a tendência à retrogradação das pastas de amido; o amido de pinhão mostrou menor sinerese sob armazenamento à 5°C e após ciclos de congelamento e descongelamento; a temperatura de armazenamento influi significativamente no poder de inchamento (PI) e no índice de solubilização dos amidos de pinhão e milho nativos; os amidos modificados apresentaram menor PI do que os nativos; a viscosidade máxima do amido de pinhão foi maior à encontrada para o amido de milho, sendo ele menos resistente à agitação

mecânica à quente (maior *breakdown*); a hidrólise ácida reduziu drasticamente a viscosidade das pastas formadas; a temperatura de gelatinização do amido de pinhão é de 47,64°C e a entalpia de gelatinização de 15,23 J.g<sup>-1</sup>; a hidrólise ácida aumentou a temperatura de gelatinização das espécies testadas.

**Palavras Chaves:** Pinhão, amido, extração alcalina, isotermas de sorção, propriedades funcionais, propriedades térmicas, hidrólise ácida, substituto de gordura.

## ABSTRACT

Pinhão is the edible seed of *Araucaria angustifolia*, being consumed in the south and southeastern Brazil mainly in the natural form. The lack of diversity in relation to its consumption results in plenty of crop and its use as animal feed, which reduces the value of product marketing and affect the economic gains of the product. The pinhão seed is composed of 34% starch and a very low content of proteins and lipids, making it favorable for obtaining starch that is widely used by the food industry. The objective of this study was to characterize a new source of starch from seeds of *Araucaria angustifolia*, through a detailed study of the method for starch extraction, the physical-chemical, functional and rheological properties of the granules and their structural modification. To do this, a protocol for the starch extraction and a study of the effect of alkaline treatment (NaOH 0.05 mol.l<sup>-1</sup> NaOH and 0.1 mol.l<sup>-1</sup>) compared to water treatment, was first established. Therefore, intrinsic fluorescence analysis, scanning electron and atomic force microscopy and x-ray diffractometry were carried out. The granular structure of pinhão starch was changed significantly when the alkaline solutions were used during extraction. The pinhão starch had a type C structure. The characteristics of native starch granules, through physical and chemical analysis, SEM, optical microscopy and syneresis were determined which found that the average diameter of starch granules varies from 7 to 20 µm and geometric shapes range from oval, the ellipsoid truncated and hemispheric. The pinhão starch was less prone to retrogradation compared to maize starch. The adsorption isotherms of native starch at temperatures of 10 °, 20 °, 30 ° and 40 ° C were drafted from fitting the experimental data to various sorption models. The Peleg model, followed by Chung-Pfost and GAB model had the highest correlation coefficients. From the GAB model were calculated monolayer moisture, enthalpy and entropy differential sorption. It was also carried out an experimental design to study the reaction of starch hydrolysis, through the influence of temperature (30° to 44°C) and hydrochloric acid concentration (1.2 to 3.2 mol.l<sup>-1</sup>) on the dextrose equivalent value (DE) and on the ability of the gel formation and its thermoreversibility. It was observed that under the highest values of temperature and concentration of acid, the value of DE was higher. In larger value of DE (3.2 mol l<sup>-1</sup> HCl and 44°C) was observed the formation of thermoreversible gel, which indicated the potential of modified starch as a fat substitute and a binder in food. The functionality of the pinhão starch was verified by analyzing the gel formation and fusion, gel thermoreversibility, tendency to retrogradation, stability to freezing and thawing, swelling power, solubility index, SEM, pasting viscosity and thermal properties such as temperature and enthalpy of gelatinization. The results showed that: only the modified starches exhibit thermoreversible gels, the native and modified pinhão starch have less tendency to retrograde than their counterparts in maize, the modification of starch reduced the tendency to retrogradation of starch pastes, the pinhão starch showed lower syneresis under storage at 5°C and after freezing and thawing, storage temperature affects significantly the swelling power (SP) and the solubility index of pinhão and maize native starches, the modified starches had lower SP of the natives, the maximum viscosity of pinhão starch was higher than that found for maize starch, the pinhão starch is less resistant to hot mechanical stirring (greater breakdown) than for maize starch, the acid hydrolysis reduced the viscosity of the pulp formed, the gelatinization temperature of pinhão starch is 47.64°C and its gelatinization enthalpy is 15.23 Jg<sup>-1</sup>; acid hydrolysis increased the gelatinization temperature of the species tested.

**Keywords:** Pinhão, starch, alkaline extraction, sorption isotherms, functional properties, thermal properties, acid hydrolysis, fat substitute.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	3
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	6
SUMÁRIO .....	7
RELAÇÃO DE TABELAS .....	11
RELAÇÃO DE FIGURAS .....	13
INTRODUÇÃO .....	15
1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISAO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 O pinhão .....	18
1.2 O grânulo de amido .....	19
1.2.1 Estrutura e composição do grânulo de amido.....	20
1.2.2 Características Microscópicas .....	23
1.2.3 Padrões de Cristalinidade.....	29
1.2.4 Gelatinização do amido .....	32
1.2.5 Retrogradação do amido .....	38
1.2.6 Propriedades de Sorção de Água.....	40
1.3 Fontes de amido e produção mundial.....	49
1.4 Necessidades de Novas Fontes de Amido .....	49
1.5 Amidos Modificados.....	50
1.5.1 Amido modificado por Oxidação .....	53
1.5.2 Amido esterificado .....	53
1.5.3 Amido modificado por ligação cruzada ( <i>Reticulação</i> ) .....	53
1.5.4 Amido Fosfatado.....	54
1.5.5 Amidos Hidrolisados .....	55
1.6 Aplicações do amido na indústria de alimentos.....	58
1.6.1 Aplicação do amido nativo.....	58
1.6.2 Aplicações do amido modificado .....	60
2 OBJETIVOS.....	63
2.1 Objetivo geral.....	63
2.2 Objetivos específicos.....	63

3	MATERIAL E MÉTODOS .....	64
3.1	Local de execução.....	64
3.2	Matéria prima.....	64
3.3	Procedimentos experimentais para a extração do amido e produção de farinha de pinhão	65
3.3.1	Obtenção da farinha de pinhão.....	65
3.3.2	Extração do amido.....	65
3.4	Avaliação dos Protocolos de Extração do Amido de pinhão.....	66
3.4.1	Rendimento do método de extração em amido .....	66
3.4.2	Análises Físico-químicas .....	66
3.4.3	Espectrometria de Fluorescência .....	67
3.4.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	67
3.4.5	Microscopia de Força Atômica (MFA).....	68
3.4.6	Difração de raios- X (DRX) .....	68
3.5	Caracterização do amido nativo extraído .....	69
3.5.1	Amido .....	69
3.5.2	Amilose.....	70
3.5.3	Cinzas.....	70
3.5.4	Fibra bruta .....	70
3.5.5	Microscopia ótica .....	70
3.5.6	Determinação das isotermas de sorção .....	71
3.5.7	Determinação das propriedades termodinâmicas.....	72
3.5.8	Sinerese do amido de pinhão nativo.....	73
3.6	Modificação Química do Amido de Pinhão Nativo.....	74
3.6.1	Modificação do amido de pinhão via hidrólise ácida para obtenção de um substituto de gordura.....	74
3.7	Análises Físico Químicas e Funcionais Realizadas no Amido Modificado de Pinhão	77
3.7.1	Dextrose Equivalente (DE) .....	77
3.7.2	Testes de Formação, Fusão e Termorreversão do Gel .....	77
3.7.3	Porcentagem de Hidrólise.....	78



3.8	Avaliação das Propriedades Funcionais e Térmicas do Amido de Pinhão Nativo e Modificado após Hidrólise Ácida .....	78
3.8.1	Porcentagem de Recuperação do Amido após a Hidrólise Ácida.....	78
3.8.2	Teste de Formação, Fusão e Termorreversibilidade do Gel.....	79
3.8.3	Retrogradação .....	79
3.8.4	Estabilidade ao Congelamento e Descongelo .....	79
3.8.5	Poder de Inchamento (PI).....	80
3.8.6	Índice de Solubilização (IS) .....	80
3.8.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	81
3.8.8	Determinação da viscosidade de pasta .....	81
3.8.9	Determinação das propriedades térmicas e termodinâmicas .....	82
4	RESULTADOS .....	83
4.1	Avaliação dos Métodos de Extração do Amido de Pinhão Nativo .....	83
4.1.1	Avaliação da semente do pinhão como fonte de amido .....	83
4.1.2	Análises Físico-químicas .....	84
4.1.3	Espectroscopia de fluorescência e determinação da proteína residual no amido extraído.....	86
4.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	88
4.1.5	Microscopia de Força Atômica (MFA).....	91
4.1.6	Difratometria de raios X (DRX) .....	93
4.2	Caracterização do Amido de Pinhão Nativo .....	95
4.2.1	Análises Físico químicas .....	95
4.2.2	Microscopia ótica .....	97
4.2.3	Isotermas de sorção do amido de pinhão nativo .....	99
4.2.4	Sinerese do amido nativo de pinhão.....	108
4.3	Modificação Química por Hidrólise Ácida do Amido Nativo de Pinhão.....	109
4.3.1	Estudo preliminar do tempo de reação de hidrólise.....	109
4.4	Avaliação das propriedades funcionais dos amidos nativos e modificados...	117
4.4.1	Porcentagem de Recuperação do Amido após a Hidrólise Ácida.....	117
4.4.2	Formação, Fusão e Termorreversibilidade do Gel.....	117

4.4.3	Determinação da tendência à retrogradação dos amidos nativos e modificados	119
4.4.4	Estabilidade ao Congelamento e Descongelamento	120
4.4.5	Poder de Inchamento (PI) e índice de Solubilização (IS) para os amidos nativos	122
4.4.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos amidos nativos e modificados	125
4.4.7	Propriedade de pasta	127
4.4.8	Determinação das propriedades térmicas e termodinâmicas	132
5	CONCLUSÕES	136
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	139
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
8	ANEXOS	156
8.1	Anexo 1: Curva padrão para determinação do valor de Dextrose Equivalente (DE)	156

## RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos por Cordenusi et al. (2004) para as análises físico-químicas realizadas com o pinhão cru e cozido .....	19
Tabela 2: Variação do tamanho e forma dos grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas .....	24
Tabela 3: Tipos de Cristalinidade de amidos obtidos de espectros de raios- X.....	31
Tabela 4: Dados obtidos por análise de DSC para diferentes espécies de amidos nativos. ...	36
Tabela 5: Modelos de isotermas de sorção comumente utilizados para materiais biológicos alimentícios.....	47
Tabela 6: Tipos de modificação da molécula de amido e técnicas de preparação.....	52
Tabela 7: Aplicações dos amidos modificados na indústria de alimentos .....	62
Tabela 8: Soluções salinas saturadas utilizadas na determinação das isotermas de adsorção de amido de pinhão. ....	72
Tabela 9: Matriz e níveis dos fatores estudados e total de tratamentos realizados.....	75
Tabela 10: Análises físico-químicas do amido de pinhão obtido através da extração com água e álcali (0,05 mol.l <sup>-1</sup> e 0,1 mol.l <sup>-1</sup> ) .....	84
Tabela 11: Área dos picos dos espectros de fluorescência dos sobrenadantes para os diferentes solventes de extração e teor de proteína residual do amido extraído, após secagem em estufa. ....	87
Tabela 12: Dados obtidos para as análises físico-químicas do amido de pinhão nativo .....	96
Tabela 13: Valores dos parâmetros preditos e erro relativo médio (ERM) obtidos para os diferentes modelos de adsorção aplicados aos dados experimentais para o amido de pinhão.....	104
Tabela 14: Resultados do estudo da variável tempo na reação de hidrólise.....	109
Tabela 15: Valor de dextrose equivalente e porcentagem de hidrólise dos hidrolisados mediante diferentes condições de hidrólise ácida do amido de pinhão.....	111
Tabela 16: Coeficientes estimados da análise de regressão para as variáveis codificadas...	111
Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para o índice de dextrose equivalente dos hidrolisados .....	112

Tabela 18: Relação entre o valor de dextrose equivalente e a porcentagem de hidrólise com a formação e termorreversão do gel para o amido hidrolisado de pinhão.....	114
Tabela 19: Formação, fusão e termorreversibilidade do gel dos amidos nativos e modificados de amido de pinhão e milho.....	118
Tabela 20: Poder de Inchamento dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho em função da temperatura .....	122
Tabela 21: Índice de Solubilização dos amidos nativos de pinhão e milho em função da temperatura .....	124
Tabela 22: Propriedade de pasta dos amidos nativos e modificados de milho e pinhão.....	128
Tabela 23: Propriedades térmicas e termodinâmicas dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho .....	133

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Seção da molécula de amilose (a) e (b) detalhe da ramificação da amilopectina, incluindo a numeração dos carbonos da glicose. ....	20
Figura 2: Diagrama da estrutura molecular da amilopectina em forma de cachos (clusters). .	22
Figura 3: Diagrama esquemático do sistema de análise por Microscopia de Força Atômica. .	25
Figura 4: Representação esquemática dos modos de operação da análise de Microscopia de Força Atômica ((a) modo contato, (b) modo não contato e (c) modo intermitente). ....	26
Figura 5: Fotomicrografias de grânulos de amido de diferentes fontes botânicas (aumento 1440 x). ....	28
Figura 6: Representação esquemática da estrutura da amilose e amilopectina do grânulo de amido nativo e do interior do grânulo. ....	30
Figura 7: Difratogramas de raios-X obtidos para amidos com padrão de cristalinidade dos tipos A, B e Vh. ....	32
Figura 8: Ilustração esquemática das temperaturas de transição ( $T_o$ , temperatura inicial-onset, $T_p$ , temperatura de pico e $T_f$ , temperatura final) obtidas pela análise de DSC. ....	35
Figura 9: Curva de viscosidade típica do RVA mostrando os parâmetros comumente avaliados. ....	37
Figura 10: Variabilidade de isotermas de sorção de água em materiais alimentícios.....	41
Figura 11: Zonas características de uma isoterma de sorção de água de um alimento.....	42
Figura 12: Tipos de isotermas descritos por Brunauer, Emmet e Teller em 1983.....	45
Figura 13: Fenômeno de histerese.....	49
Figura 14: Cálculo do índice de cristalinidade, onde $A_a$ é a área referente a fração cristalina do polímero e $A_c$ , a área referente a fração amorfa do polímero. ....	69
Figura 15: Espectro de fluorescência de proteínas presentes nos sobrenadantes obtidos após lavagem e centrifugação do material amiláceo.....	86
Figura 16: Imagens da MEV do amido de pinhão obtido após os diferentes tratamentos.....	89
Figura 17: Imagens de MEV da farinha de pinhão (esquerda, aumento de 900x, direita, aumento de 2000x).....	91
Figura 18: Imagens de MFA e dos histogramas de distribuição do tamanho de altura das superfícies dos grânulos do amido de pinhão obtido após os diferentes tratamentos.....	92

Figura 19: Perfis de DRX dos grânulos de amido de pinhão .....	94
Figura 20: Micrografia em luz polarizada (200X) do amido de pinhão nativo, sob diferentes temperaturas (A:40°C; B: 45,3°C; C: 47,1°C; D: 50,3°C) .....	98
Figura 21: Valores experimentais de umidade de equilíbrio (base seca) em função da atividade de água ( $a_w$ ) para amido de pinhão em diferentes temperaturas e modelo de GAB .....	99
Figura 22: Modelo de GAB ajustado aos dados experimentais de umidade de equilíbrio (base seca) em função da atividade de água ( $a_w$ ) para amido de pinhão em diferentes temperaturas .....	102
Figura 23: Entalpia diferencial de adsorção do amido de pinhão em função do conteúdo de umidade de equilíbrio .....	106
Figura 24: Entropia diferencial de adsorção do amido de pinhão em função da umidade de equilíbrio .....	107
Figura 25: Sinerese das pastas de amido de milho e pinhão nativos durante armazenagem a 5°C durante 28 dias .....	108
Figura 26: Valores de Dextrose Equivalente observado como uma resposta da interação entre as variáveis temperatura e concentração de ácido clorídrico, após hidrólise ácida. ....	113
Figura 27: Opacidade da pasta dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho (transmitância à 625nm).....	120
Figura 28: Sinerese das pastas de amido de milho e pinhão seis ciclos de congelamento e descongelamento .....	121
Figura 29: Micrografias obtidas através de MEV do amido de pinhão nativo e modificado, sendo A, pinhão nativo (2000x); B, pinhão modificado (2000x).....	126
Figura 30: Micrografias obtidas através de MEV do amido de milho nativo e modificado, sendo A, milho nativo (2000x); B, milho modificado (2000x).....	126
Figura 31: Viscoamilogramas agregados dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho. ....	128
Figura 32: Termogramas obtidos através de DSC dos amidos nativos de pinhão, safra 2007 (A) e milho (B) e modificados via hidrólise ácida (44°C e 3,2 mol.l <sup>-1</sup> de HCl) de pinhão (C) e milho (D).....	133

## INTRODUÇÃO

O Pinheiro do Paraná (*Araucária angustifolia*) é uma árvore pertencente à família das Araucárias, sendo amplamente distribuído no sul do Brasil, no Paraguai, na Argentina e no Chile, em florestas nativas (Wosiacki e Cereda, 1984; Cordenunsi et al., 2004). O pinhão é a semente produzida por essa árvore.

A *Araucária angustifolia* possuía, até algum tempo atrás, uma elevada importância comercial, como fonte de madeira para a indústria moveleira e de construção civil. Devido à sua extração irracional, por motivos comerciais, ou desmatamento (pela necessidade de ampliar a área para a agricultura tradicional), a *Araucária* está em risco de extinção e atualmente encontra-se sob proteção ambiental. Sendo assim, pesquisas relacionadas ao uso sustentável dos derivados da *Araucária*, como o pinhão, poderiam estimular a preservação da espécie (Wosiacki e Cereda, 1984).

O pinhão é considerado uma fonte de amido, devido à presença de uma alta quantidade (~34%) deste componente. Também é característica da semente o baixo conteúdo de proteínas (~3%) e lipídios (1,3%) (Cordenunsi et al., 2004).

O amido é um polissacarídeo constituído basicamente por polímeros de  $\alpha$ -D-glicose, a amilose e a amilopectina. Devido à diversidade biológica e ambiental, os amidos se apresentam como grânulos das mais diversas formas, tamanhos e propriedades. O domínio e o conhecimento dessas características são uma importante ferramenta para a valorização de seu potencial (Marcon et al., 2007).

Nos últimos anos, tem se verificado o esforço de pesquisadores em encontrar novas fontes de amido nativos não convencionais, com propriedades específicas, principalmente para resistir a tratamentos industriais estressantes que deterioram a estrutura do gel de amido, como: temperaturas altas (hidrólise do gel de amido e diminuição da viscosidade), baixas temperaturas (que ocasionam a sinerese do produto), condições de alta acidez (desnaturação da estrutura do gel de amido) e fortes tensões mecânicas (corte, homogeneização, etc.) (Bermudez, 1997). No entanto, apesar do amido nativo ser um bom

estabilizador de textura e regulador em sistemas alimentícios, possui limitações como a baixa resistência e decomposição térmicas e a alta tendência à retrogradação, o que limita o seu uso para algumas aplicações industriais (Hermansson e Svegmark, 1996).

Para contornar os problemas de funcionalidade dos amidos nativos em uso, atualmente é realizada a prática de modificação da molécula do polissacarídeo, com fins de alteração das propriedades funcionais para melhor adequação às necessidades do mercado. Uma das modificações de amido amplamente utilizada é a hidrólise ácida, que consiste em tratar o amido com soluções ácidas, abaixo da temperatura de gelatinização. Deste processo pode-se obter um polímero com grande aplicabilidade como substituto de gordura (Zambrano e Camargo, 2001a).

Para o uso como substitutos de gordura, especificamente, são recomendados amidos com um conteúdo médio de amilose de 20%, com baixos teores de lipídios e proteínas aderidos, que formam pastas claras e que possuam sabor neutro (Vanderveen e Glinsmann, 1992), características que, segundo Bello-Pérez et al. (2006), encontram-se no amido de pinhão.

Amante (1986) relata que para um vegetal servir como fonte de amido, ele deve conter quantidade representativa desse carboidrato, ser de fácil extração e conter propriedades de interesse econômico. O amido do pinhão, segundo Wosiacki e Cereda (1984), pode ser facilmente obtido através da sedimentação, após trituração das sementes sem casca. Além disso, o polímero possui propriedades como resistência ao aquecimento e desintegração mecânica, baixa temperatura de pasta e relativa estabilidade ao armazenamento sob refrigeração.

Na bibliografia, pouco se encontra a respeito desta semente, em relação aos seus aspectos tecnológicos. Dentre os trabalhos que abordam algum aspecto, pode-se citar Stahl et al. (2007), Bochi et al. (2002), Bello-Pérez et al. (2006), Olivarez & Noreña (2006) e Cladera-Olivera et al., (2008). Olivarez & Noreña (2006) estudaram as curvas de secagem do pinhão cru nas temperaturas de 55, 65 e 75° C, no entanto, o tempo total de secagem foi de 8 h, insuficiente para obter níveis de umidade menores que 70% em base seca. Cladera-Olivera (2008) estudaram as isotermas de sorção do pinhão cru, entretanto não existem relatos a respeito das isotermas de sorção de amido de pinhão.



Bello-Pérez et al. (2006) estudaram o amido nativo de pinhão, sugerindo uma metodologia para a sua extração e incluindo a caracterização do polissacarídeo. No entanto, a metodologia de extração descrita não previu a presença de proteínas, que mesmo em pequenas quantidades gera um menor grau de pureza do amido obtido. Também estes autores reportaram às propriedades reológicas  $G'$ ,  $G''$  e  $\tan \Delta$  em dispersões de amido (10% p/v) quando aquecidas (25 à 90°C) embora não tenham abordado o comportamento reológico da pasta/gel de amido, parâmetro muito importante quando se pretende avaliar o comportamento do amido em um processo alimentício.

Em relação à modificação ácida da molécula do amido de pinhão, objetivando a obtenção de propriedades funcionais com maiores possibilidades de aplicação na indústria, principalmente alimentícia, nada consta em literatura.

Através da ausência de informações completas a respeito do amido de pinhão, tanto na forma nativa quanto após algum processo de modificação de sua molécula, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o amido de pinhão a fim de determinar as suas propriedades funcionais, térmicas e reológicas e todas as suas possíveis aplicações na indústria de alimentos.

# 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISAO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 O PINHÃO

O pinhão é a semente da árvore *Araucaria angustifolia* (*Araucaria brasiliense*), pertencente à família Araucariaceae. É amplamente consumido no estado brasileiro do Rio Grande do Sul durante os meses de safra (maio a agosto) (Cordenunsi et al., 2004)., onde é considerado a principal espécie de conífera nativa de importância econômica (Zandavalli et al., 2004). Os países da Argentina, Paraguai e Chile também apresentam produção desta conífera (Cordenunsi et al., 2004).

Historicamente, pode-se dizer que o pinhão era uma importante fonte de alimentos para as tribos indígenas caçadores-coletores-pescadores, que no final do verão ou início do outono, coletavam a semente, um dos seus alimentos mais importantes. Na ocasião, a semente era desidratada para posterior consumo, e, quando consumida, era diretamente assada no borralho, cozida ou transformada em farinha, com a qual eram elaborados diversos produtos (Ribeiro, 2000).

Atualmente, o pinhão é consumido após cozimento e posterior descascagem, sendo considerado uma boa fonte de carboidratos complexos (amido e fibra dietética), magnésio e cobre, possuindo baixos conteúdos de proteínas, lipídios, açúcares solúveis e componentes fenólicos (Cordenunsi et al., 2004). A Tabela 1 mostra os valores obtidos nas análises físico-químicas do pinhão cru e cozido realizados por estes autores.

**Tabela 1:** Resultados obtidos por Cordenusi et al. (2004) para as análises físico-químicas realizadas com o pinhão cru e cozido

<b>Análise (%bu*)</b>	<b>Pinhão cru</b>	<b>Pinhão cozido</b>
Umidade	49,50 ± 0,02	50,35 ± 0,71
Proteína	3,57 ± 0,05	2,31 ± 0,05
Lipídeos	1,26 ± 0,07	1,26 ± 0,09
Resíduo mineral fixo	1,60 ± 0,01	1,41 ± 0,02
Amido	36,28 ± 0,11	34,48 ± 0,72
Fibra dietética solúvel	0,63 ± 0,13	0,55 ± 0,18
Fibra dietética insolúvel	4,26 ± 0,20	5,17 ± 0,25
Açúcares solúveis totais	2,43	0,64

\*bu, base úmida

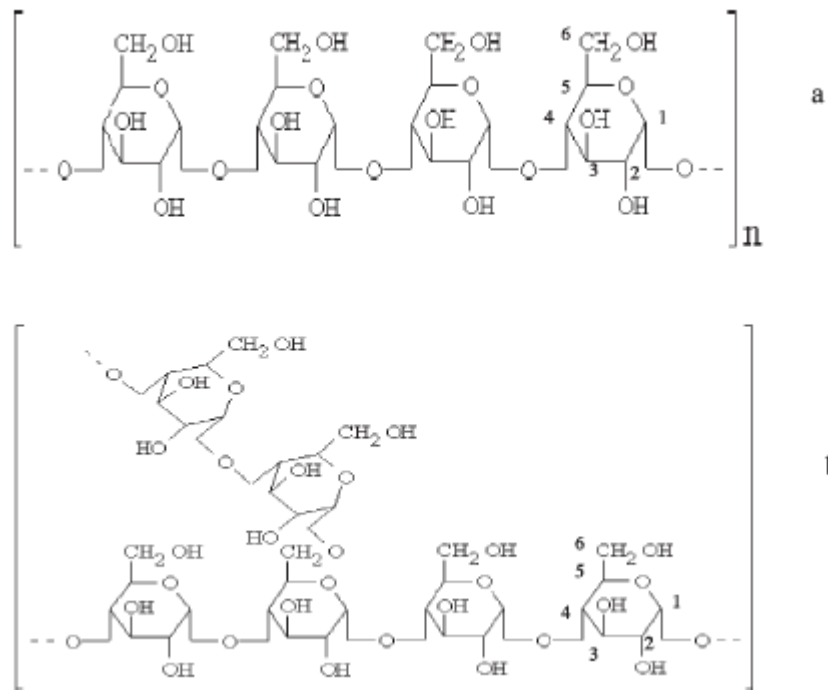
## **1.2 O GRÂNULO DE AMIDO**

O amido está disponível em abundância na natureza, sendo encontrado em todas as plantas e extraído de folhas, raízes, caules, sementes e frutos. A planta serve, assim como aos seres humanos e animais, como alimento, funcionando como componente de reserva energética. Entretanto, o homem encontrou aplicações diversificadas para o amido, que vai além de sua função original como fonte de energia, sendo utilizado, assim como seus derivados, em quase todas as indústrias.

Na indústria de alimentos e farmacêutica o amido é utilizado para alterar diversas características, tais como, textura, aparência, umidade, consistência e estabilidade durante o processamento e posterior armazenagem. Pode ser utilizado para ligar ou desintegrar; expandir ou tornar denso, clarear ou tornar opaco, atrair ou inibir umidade, produzir textura curta ou longa, lisa ou de polpa, coberturas leves ou crocantes. Pode ser usado para estabilizar emulsões ou formar filmes resistentes a óleo. Ainda pode ser utilizado para auxiliar o processo de obtenção de algum produto, assim como a embalagem final do mesmo (National Starch and Chemical Industrial Ltda, 1995).

### 1.2.1 Estrutura e composição do grânulo de amido

O amido é um homopolissacarídeo formado por dois polímeros: amilose e amilopectina, ambos formados por unidades de D-glucose. Estas unidades ligam-se através da condensação enzimática que ocorre predominantemente entre átomos de carbono 1 e 4 (Figura 1) e ocasionalmente entre átomos de carbono 1 e 6 (Manners, 1989).



**Figura 1:** Seção da molécula de amilose (a) e (b) detalhe da ramificação da amilopectina, incluindo a numeração dos carbonos da glicose.

Fonte: Franco et .al (2002)

Quando somente ligações  $\alpha$ -1,4 são formadas, o homopolímero resultante possui cadeia linear, sendo denominada amilose. A distribuição da massa molar da amilose é variável com as fontes botânicas e também com a forma de extração (Buléon et al., 1998), podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose (Wurzburg, 1986). De acordo com

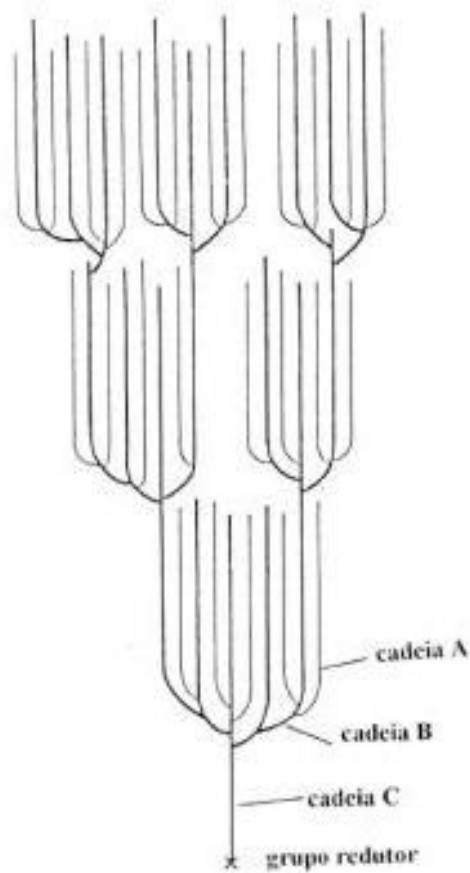
Buléon et al. (1998), não existem variações significativas entre as massas molares médias de amiloses de cereais quando comparadas com as de raízes ou tubérculos.

A amilose se caracteriza por apresentar uma estrutura helicoidal, na sua forma cristalina, dentro da qual é possível acomodar moléculas de iodo, formando um complexo de cor azul intensa, sendo essa reação a base de uma das técnicas utilizadas para a determinação de amilose (*blue value*) e indicação da presença de amido (Barros, 1984; Jane et al., 1984).

É interessante notar que a amilose e a celulose são muito semelhantes em estrutura, somente se diferenciando pelo arranjo espacial das ligações entre os carbonos 1 e 4, que na celulose, devido às fortes ligações intermoleculares da  $\beta$ -glicose a tornam não digerível pelos seres humanos. A ligação  $\alpha$  da amilose permite que a molécula seja flexível e digerível (National Starch and Chemical Industrial Ltda (1995).

O segundo tipo de polímero existente no amido, a amilopectina, se desenvolve quando a condensação enzimática entre unidades de glicose ocorre entre os carbonos 1 e 6. Esta ligação ocasional, juntamente com as predominantes ligações 1-4, resulta em uma ramificação e na formação de uma molécula muito maior em tamanho do que a amilose, mas constituída por cadeias lineares de 20 a 25 unidades de glicose (Buléon et al. 1998; National Starch and Chemical Industrial Ltda, 1995; Whistler et al., 1997).

Uma molécula de amilopectina consiste em uma cadeia principal C que carrega o grupo redutor da molécula, e numerosas cadeias ramificadas, denominadas cadeias A e B. As cadeias A são aquelas conectadas a outras cadeias via ligações  $\alpha$ , 1-6, entretanto não carregam qualquer ramificação. As cadeias B são conectadas a outras cadeias também via ligações  $\alpha$ , 1-6, que possuem uma ou mais cadeias A ou B ligadas a ela através de ligações  $\alpha$ , 1-6 (Franco et al., 2002). Este modelo proposto foi chamado de “Modelo de Clusters da Amilopectina” e é apresentado na Figura 2.



**Figura 2:** Diagrama da estrutura molecular da amilopectina em forma de cachos (clusters).

Fonte: Eliasson et al. (1987)

Os mesmos autores citam que French (1973) e Robin et al. (1975) propuseram um modelo para a amilopectina, no qual os *clusters* ou cachos, associados de cadeias A passariam a constituir uma camada cristalina na direção do eixo da cadeia. Tais *clusters* associados constituiriam a fração dos grânulos de amido resistentes ao ácido. As áreas intercristalinas entre os sucessivos *clusters* ou camadas cristalinas conteriam a maior parte das ligações  $\alpha$ -1-6. No entanto existem variações para este modelo proposto por outros autores e ainda não se garante que o mesmo aplica-se a todas as amilopectinas, independentemente da fonte botânica.

A proporção existente entre a amilose e a amilopectina no grânulo de amido, assim como a sua organização física são responsáveis pelas propriedades físico-químicas e funcionais do amido e também pela sua susceptibilidade ao ataque enzimático, características particulares à fonte botânica a qual o amido é extraído (Santiago et al., 2004). Geralmente os amidos contêm 15 a 30% de amilose e 70 a 85% de amilopectina, existindo algumas variedades de milho, sorgo, cevada e arroz referidas como “waxy” ou ceroso que contêm baixas quantidades de amilose, de 0 a 8%, assim como amidos com alta quantidade da mesma (50 a 70%) (Jane et al., 1994).

As moléculas de amido são capazes de formar ligações por pontes de hidrogênio sempre que se encontrarem paralelas umas às outras. Devido a este fato aparecem zonas alternadas amorfas e cristalinas. Esta associação é fraca na área amorfa e mais forte nas áreas cristalinas (Barros, 1984).

O resultado destas interações é a birrefringência do grânulo de amido, que apresenta uma cruz quando examinados em microscópio sob a luz polarizada, a chamada “Cruz de Malta”, que pode ser concêntrica ou excêntrica. Entretanto, birrefringência e cristalinidade não estão necessariamente associadas, sendo a primeira apenas um indicativo de que existe um alto grau de organização, sem que isto se refira a qualquer forma cristalina (Zobel, 1988).

### **1.2.2 Características Microscópicas**

Os grânulos de amido diferem entre si na forma, tamanho e outras características físicas, de acordo com a planta de origem (Franco et al., 2002).

Geralmente, o tamanho do grânulo de amido fica na faixa de 1 a 100  $\mu\text{m}$  e a sua forma varia fortemente. A Tabela 2 apresenta estas variações para alguns amidos de diferentes origens botânicas.

**Tabela 2:** Variação do tamanho e forma dos grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas

<b>Origem do amido</b>	<b>Tamanho médio ( m)</b>	<b>Forma</b>
Trigo Normal	13-19	Lenticular
Milho Normal	12-15	Poliédrico e arredondado
Batata Normal	40	Oval
Arroz	6	Poliédrico
Mandioca	5 a 35	Redondo ou oval

Fonte: Buléon et al. (1998) e Bermudez (1997).

As informações sobre o tamanho de grânulos de amido disponíveis na literatura podem ser bem aproveitadas para estabelecer a variabilidade do tamanho dos grânulos, o que normalmente se descreve como a faixa entre o diâmetro maior e o diâmetro menor da população de grânulos de uma determinada espécie botânica (Franco et al., 2002). O tamanho dos grânulos e sua distribuição estão entre os fatores que mais acentuadamente afetam o comportamento dos amidos o que pode ser exemplificado para os amidos de trigo e araruta que devido às pequenas diferenças existentes entre o maior e o menor diâmetro apresentam um formato mais regular, que segundo Satin (2000) é desejável para o uso na fabricação de papéis químicos, como aqueles usados para cópias e fax.

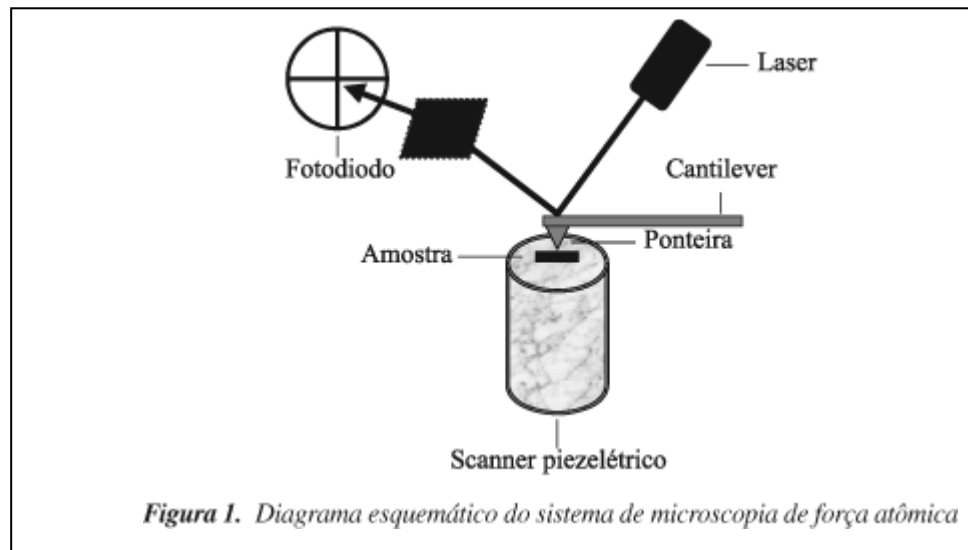
A escolha da técnica e do microscópio para uma visualização de alta resolução da estrutura dos grânulos de amido depende do tipo de informação requerida, ou seja, superfície ou estrutura interna. Quando se procura avaliar a superfície do grânulo de amido podem-se utilizar, basicamente, duas técnicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA).

#### **1.2.2.1 Microscopia de Força Atômica (MFA)**

O princípio de funcionamento do MFA baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento (100 a 200  $\mu\text{m}$ ) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A sonda (ponteira + cantilever) é o componente básico e, para alcançar resolução



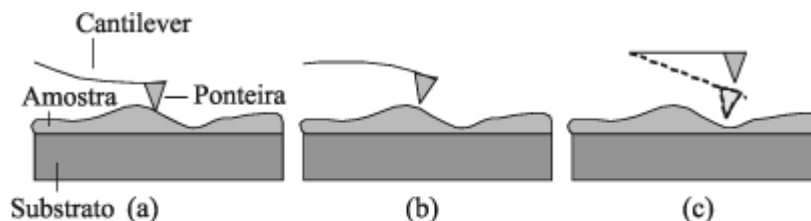
atômica, a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos (Howland e Benatar, 1996). A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever (Figura 3). À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de irregularidades encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A força mais comumente associada com MFA na deflexão do cantilever é a força de van der Waals (Worcester et al., 1988).



**Figura 3:** Diagrama esquemático do sistema de análise por Microscopia de Força Atômica.

Fonte: Ferreira e Yamanaka (2006).

A técnica de MFA, conforme apresentado na Figura 4, pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente ("tapping") (Chichester, 1998).



**Figura 4:** Representação esquemática dos modos de operação da análise de Microscopia de Força Atômica ((a) modo contato, (b) modo não contato e (c) modo intermitente).

Fonte: Ferreira e Yamanaka (2006)

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos angstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato (Ferreira e Yamanaka, 2006).

No modo de não-contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de angstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de  $10^{-12}$  N. Essa oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de Van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas. O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras (Worcester et al., 1988). Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente (Ferreira e Yamanaka, 2006).

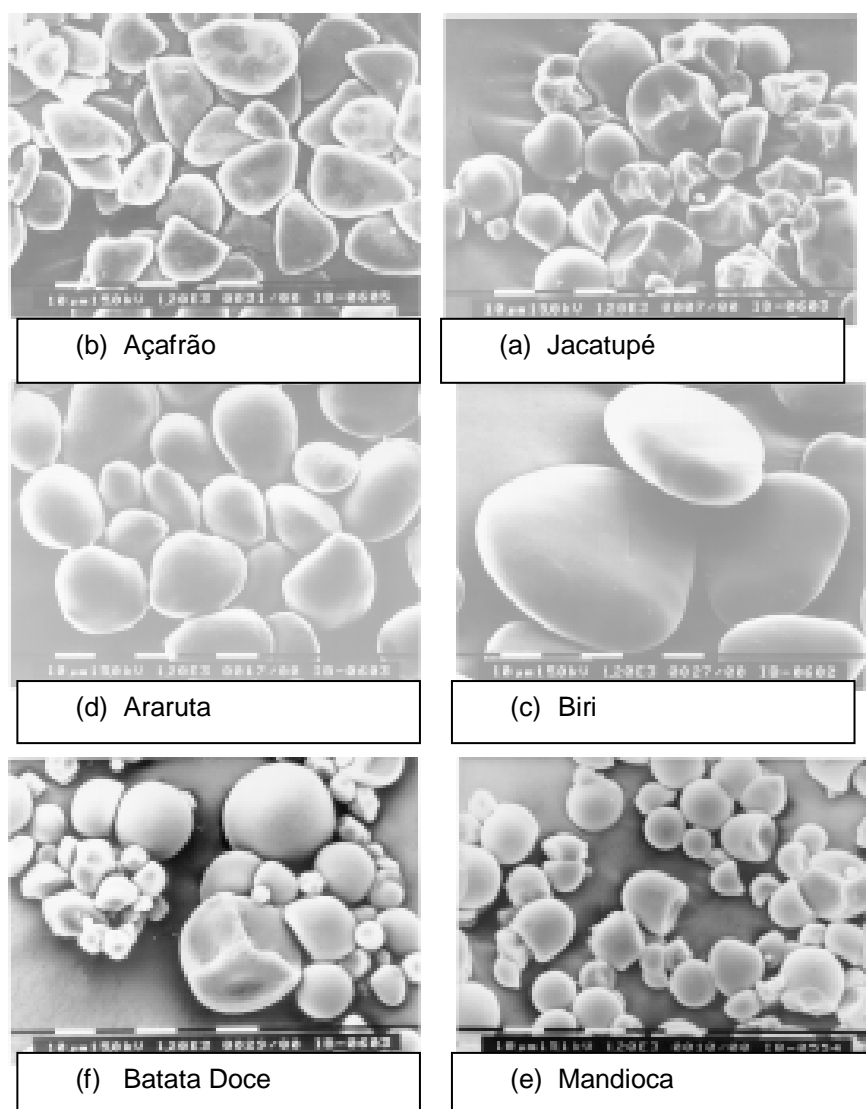
O modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é

utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (Howland e Benatar, 1996).

#### **1.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento muito versátil e usado rotineiramente em análises micro estruturais de materiais sólidos. Apesar da complexidade do mecanismo para a obtenção da imagem, a sua interpretação é muito simples. O aumento máximo conseguido pelo microscópio eletrônico de varredura, fica entre o microscópio óptico (MO) e o microscópio eletrônico de transmissão (TEM), sendo a sua vantagem em relação ao MO a sua alta resolução, que fica na ordem de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , enquanto que para o MO a resolução fica na ordem de 0,5  $\mu\text{m}$ . Comparado com o TEM a grande vantagem está na elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional). Também a possibilidade de combinar a análise estrutural com a micro análise química são fatores que contribuem para o amplo uso desta técnica.

Em relação ao amido, o MEV consegue diferenciar tamanho e forma dos grânulos. O tamanho dos grânulos varia de 2 a 100  $\mu\text{m}$  e diferentes formas são encontrados, ambos dependentes da espécie da planta analisada. Tanto a forma quanto o tamanho dos grânulos são característicos de cada espécie de planta e podem ser usados para identificar a origem de um amido (Coulter, 2004). A Figura 5 apresenta fotos de MEV de diferentes fontes de amido, onde se pode verificar os diferentes formatos e tamanhos de grânulos.



**Figura 5:** Fotomicrografias de grânulos de amido de diferentes fontes botânicas (aumento 1440 x).

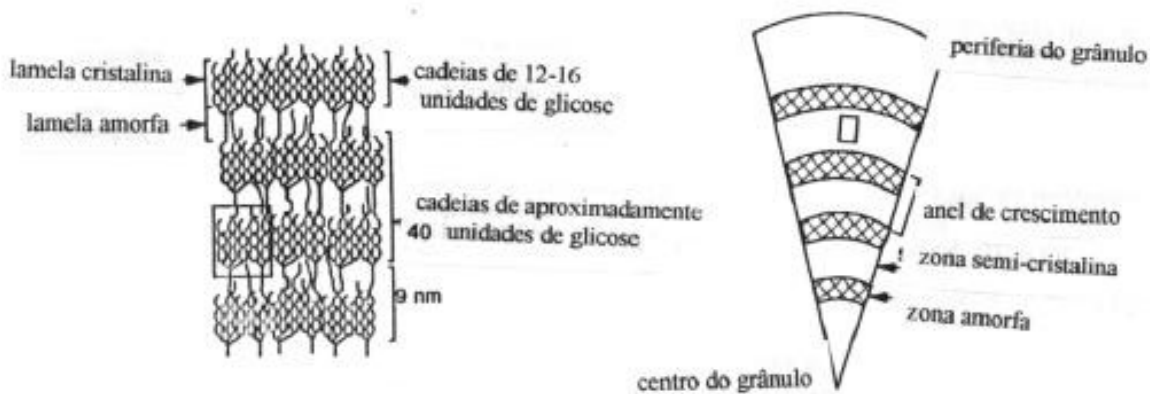
Fonte: Leonel et al. (2000)

### 1.2.2.3 Microscopia Óptica

Outra técnica bastante utilizada no estudo da estrutura dos grânulos de amido é o uso da luz polarizada, através de um microscópio óptico, o que permite visualizar, como consequência da cristalinidade do grânulo, uma cruz de malta. Além disto, com a utilização de um segundo filtro, pode-se ter a confirmação de uma orientação radial do eixo principal dos cristais, caso for revelada uma birrefringência positiva (Gallant et al., 1997).

### 1.2.3 Padrões de Cristalinidade

Os grânulos de amido exibem uma estrutura do tipo “cebola” com variado número de anéis de crescimento concêntricos, prontamente visíveis através de microscopia eletrônica e óptica. A difratometria de raios-x aponta que estes grânulos exibem uma estrutura lamelar com subunidades nanométricas da ordem de 9-10 nm. Atualmente é sabido que a cristalinidade parcial dos grânulos de amido nativo é devida à organização de *clusters* da cadeia de amilopectina. As cadeias de amilopectina dentro dos grânulos estão radialmente arranjadas com seus grupos terminais não redutores em direção à superfície e estas são organizadas alternando áreas cristalinas e amorfas (Figura 6) (Jenkins et al., 1993). O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas. A região onde se concentra a amilopectina é mais densa ou cristalina. Sendo mais compacta, dificulta a entrada de moléculas como as de água e enzimas, apresentando-se, portanto mais resistente ao processo de hidrólise (Mestres, 1996).



**Figura 6:** Representação esquemática da estrutura da amilose e amilopectina do grânulo de amido nativo e do interior do grânulo.

Fonte: Buléon et al. (1998)

A cristalinidade do grânulo de amido que gira em torno de 15 a 45% se deve basicamente à amilopectina (Zobel, 1988) e pode ser caracterizada por difração de raios X em três padrões principais: A, B ou C, como consequência do empacotamento em dupla hélice das cadeias ramificadas deste polímero (Zobel, 1988). Segundo Mestres (1996) estes padrões têm as seguintes características:

- Tipo A apresenta maiores picos de intensidade de refração para os ângulos a 2 Å a 15, 17, 18 e 23 Å, sendo típico dos amidos de cereais;
- Tipo B apresenta maiores picos de intensidade de refração para os ângulos a 2 Å a 5,6, 15, 17, 22 e 23 Å, sendo mais comum nos amidos de tuberosas, sendo o representante mais típico o amido de batata com o pico a 5,6 Å;
- Tipo C é uma mistura dos precedentes sendo o amido de mandioca um exemplo típico. Classifica-se do tipo C com características de A e B, mas predominantemente A. Este tipo compreende os amidos de ervilha e algumas variedades de feijão (Rosenthal, 1974).

Quando a amilose estiver complexada com compostos orgânicos, água ou iodo, o tipo V pode aparecer. Diferentemente dos tipos A, B e C, o tipo V pode existir na forma anidra ( $V_a$ ) ou hidratada ( $V_h$ ) (Mestres, 1996).

### 1.2.3.1 Avaliação da cristalinidade do grânulo de amido: Difractometria de raios- X

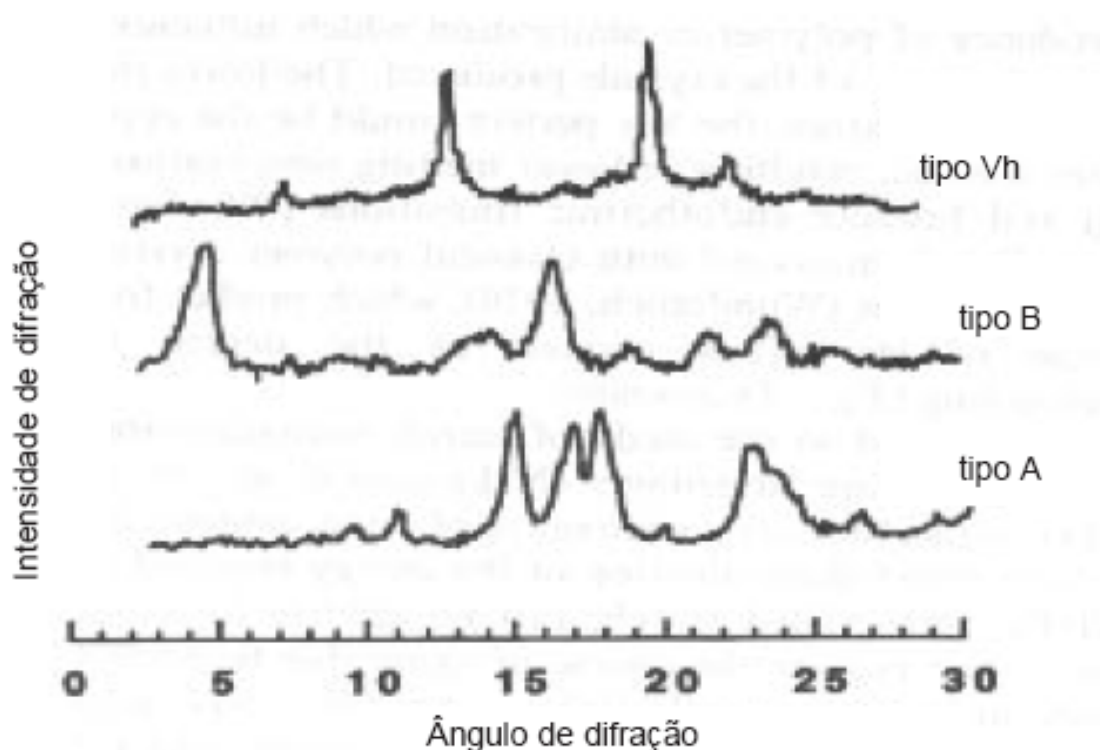
A difração de raios-X possibilita a definição dos tipos de arranjos formados nas áreas cristalinas, segundo a posição dos picos de difração, conforme mostra a Tabela 3 .

**Tabela 3:** Tipos de Cristalinidade de amidos obtidos de espectros de raios- X

Origem botânica	Tipo cristalino	Cristalinidade (%)
CEREAIS		
Milho	A	40
Arroz	A	40
TUBEROSAS		
Mandioca	C = A + B	40
Batata	B	25

Fonte: Adaptado de Mestres (1996).

A Figura 7 apresenta os picos de difração de cada tipo cristalino (A, B e  $V_h$ ), apresentados por um gráfico típico de difração de raios-X. Segundo Mestres (1996), todos os amidos são semicristalinos e a cristalinidade é calculada a partir da área dos picos de difração, sendo de cerca de 40% para a maioria dos amidos. A interpretação destes picos permite calcular a estrutura molecular dos tipos cristalinos, sendo a organização das hélices pareadas (zonas cristalinas) que diferencia os picos cristalinos.



**Figura 7:** Difratoogramas de raios-X obtidos para amidos com padrão de cristalinidade dos tipos A, B e Vh.

Fonte: Buléon et al. (1998)

#### 1.2.4 Gelatinização do amido

O aquecimento de suspensões de amido em excesso de água (>60%) causa uma transição irreversível denominada gelatinização (Franco et al., 2002). Este fenômeno dá-se quando o grânulo de amido, nestas condições, intumescce com gradual hidratação devido ao rompimento das pontes de hidrogênio mais fracas das áreas amorfas (National Starch and Chemical Industrial Ltda, 1995). Nestas condições, os grupamentos hidroxila são liberados, ficando prontamente disponíveis para as ligações com as moléculas de água e em consequência disto ocorre a expansão dos grânulos de amido (Rickard et al., 1991). Sob aquecimento à temperatura constante, eventualmente todas as regiões amorfas são desestabilizadas e as regiões cristalinas começam a gelatinizar. A extensão deste processo



é dependente da temperatura. Com a elevação desta, a extensão de regiões cristalinas que são gelatinizadas também aumenta. Quando a temperatura é suficientemente alta ( $T > 80^{\circ}\text{C}$ ), ambas as regiões, amorfas e cristalinas são gelatinizadas, sendo desta forma, as regiões amorfas interpretadas como promotoras das regiões cristalinas do grânulo quando ocorre a gelatinização (Franco et al., 2002).

Fisicamente, este inchamento é observado através do aumento da viscosidade, ficando a dispersão de amido transparente, devido à maior incorporação de água, após certo período de tempo. A temperatura na qual a viscosidade começa a aumentar é chamada “temperatura de pasta”, parâmetro que pode ser obtido através de amilogramas provenientes de análises de viscosidade obtidas por viscoamilógrafos (Brabender ou RVA) (Marcon et al., 2007). Esta temperatura de pasta não deve ser confundida com a chamada temperatura de gelatinização, que consiste na temperatura ou faixa de temperatura onde ocorre a perda de birrefringência (Biliaderis, 1991) e onde acima da mesma, o processo de expansão é irreversível, devido à perda da estrutura cristalina (Morrison, 1995).

É considerada temperatura de gelatinização a faixa de temperatura na qual a perda da birrefringência é primeiramente notada, até o ponto onde menos de 10% de birrefringência permanece. Este gradiente de temperatura é influenciado pelas forças de ligação no grânulo, a qual variam de acordo com as espécies (Franco et al., 2002), isto é, composição do grânulo (razão amilose /amilopectina, conteúdo de fósforo, lipídios, enzimas e proteínas presentes), estrutura molecular da amilopectina (extensão da ramificação, massa molecular e arquitetura granular – razão entre regiões cristalinas e amorfas), morfologia do grânulo e distribuição de tamanhos dos grânulos do amido (McCarthy et al., 2007).

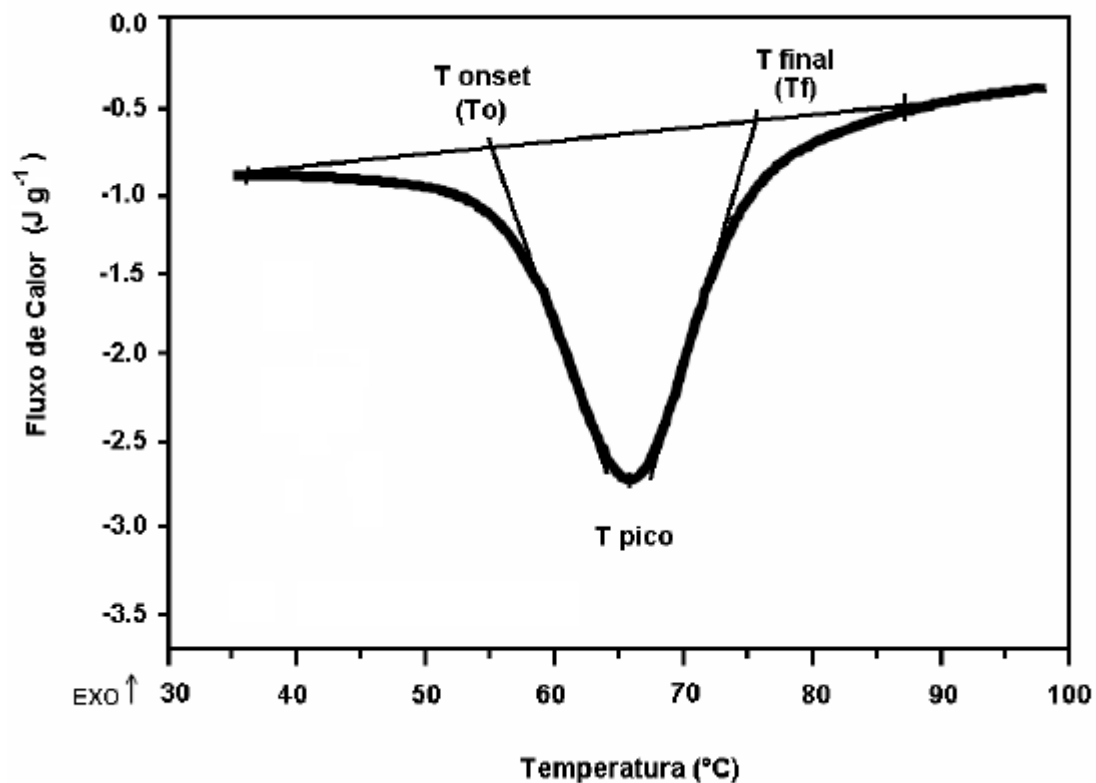
Neste aquecimento progressivo ocorre a fusão das regiões cristalinas do grânulo com o rompimento das ligações hidrogênio, o que pode também ser alcançado através da utilização de produtos químicos adequados, à temperatura ambiente. Isto ocorre, pois a temperatura de gelatinização também é função do pH quando a concentração do íon hidrogênio está fora da faixa 5,9 à 7,0. Como exemplo típico o cloreto de sódio é utilizado para aumentar a temperatura de gelatinização, enquanto que o hidróxido de sódio é usado para baixar esta temperatura. A esterificação ou eterificação também reduz a temperatura de gelatinização (Barros, 1984; Biliaderis, 1991).

Sendo a gelatinização do amido um processo de absorção de energia, a mesma pode ser caracterizada por uma endoterma obtida através de calorimetria diferencial de varredura (DSC), pela perda de birrefringência, observada pela microscopia ótica (perda da 'cruz de malta') e pelo desaparecimento da cristalinidade evidenciado pela difração de raios-X (Garcia et al., 1996).

A faixa de temperatura de gelatinização do amido é uma característica do genótipo da planta na qual o amido é sintetizado e é afetada pelas condições do meio (Ellis et al, 1998). Rickard et al. (1991) complementam que como os grânulos da mesma fonte botânica não têm exatamente a mesma temperatura de gelatinização, em uma população de grânulos naturais a transição ocorre a um intervalo de 5 a 15°C.

#### **1.2.4.1 Avaliação da Gelatinização do amido através de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é a técnica mais usada para detectar as transições térmicas de primeira (fusão) e segunda ordem (vítreas) em diversos materiais (McCarthy et al., 2007) e quando aplicada ao amido, fornece medidas quantitativas do fluxo de calor associado à gelatinização, onde a presença dos picos endotérmicos é um indicativo da fusão da molécula. Para detecção das fases de transição nos amidos, o método de DSC tem a vantagem da independência com a birrefringência dos grânulos. Esta é uma diferença importante, pois em alguns casos a birrefringência está ausente devido aos cristais serem pequenos ou casualmente orientados e também porque a birrefringência pode estar relacionada à orientação molecular nas regiões amorfas (Zoben & Stephen, 1995). Os dados de temperatura obtidos por este método de análise são as temperaturas de início da gelatinização- *onset* ( $T_o$ ), de pico endotérmico ( $T_p$ ) e de conclusão do fenômeno de gelatinização ( $T_f$  ou  $T_c$ ), assim como dados referentes à entalpia da reação ( $\Delta H_{gel}$ ) (Figura 8) McCarthy et al., 2007). A  $T_o$  é a temperatura em que a linha tangencial do lado da temperatura mais baixa do pico se cruza com a linha de base;  $T_p$  é a temperatura na ponta do pico e  $T_f$  é a temperatura em que a linha tangencial do lado da temperatura alta do pico se cruza com a linha de base. A  $\Delta H_{gel}$  é a área sob o pico limitado pela linha base no gráfico (Altay e Gunasekaran, 2006).



**Figura 8:** Ilustração esquemática das temperaturas de transição ( $T_o$ , temperatura inicial-onset,  $T_p$ , temperatura de pico e  $T_f$ , temperatura final) obtidas pela análise de DSC.

Fonte: Altay e Gunasekaran (2006).

As mudanças de entalpia observadas em uma endoterma obtida por DSC geralmente são relacionadas à transição do tipo ordem/desordem dos cristais presentes e a entalpia específica de gelatinização para amidos nativos é de cerca de  $15 \text{ J.g}^{-1}$ , sendo mais elevadas para amidos de tuberosas (Franco et al., 2002). A Tabela 4 mostra os valores das temperaturas de pico de endotermas, obtidas por DSC para cereais e tuberosas, assim como os valores de  $\Delta H$  em  $\text{J.g}^{-1}$ .

**Tabela 4:** Dados obtidos por análise de DSC para diferentes espécies de amidos nativos.

Origem botânica	Temperatura do Pico (°C)	$\Delta H$ (J/g)*
<b>CEREAIS</b>		
Milho	69,6	7,5
Arroz	66,3	8,8
Trigo	59,2	8,1
<b>TUBEROSAS</b>		
Mandioca	65	17
Batata	64,4	11

Fonte: Modificado de Mettler-Toledo (2007) e Mestres (1996).

\*massa seca

#### 1.2.4.2 Avaliação da viscosidade do gel do amido através de amilogramas

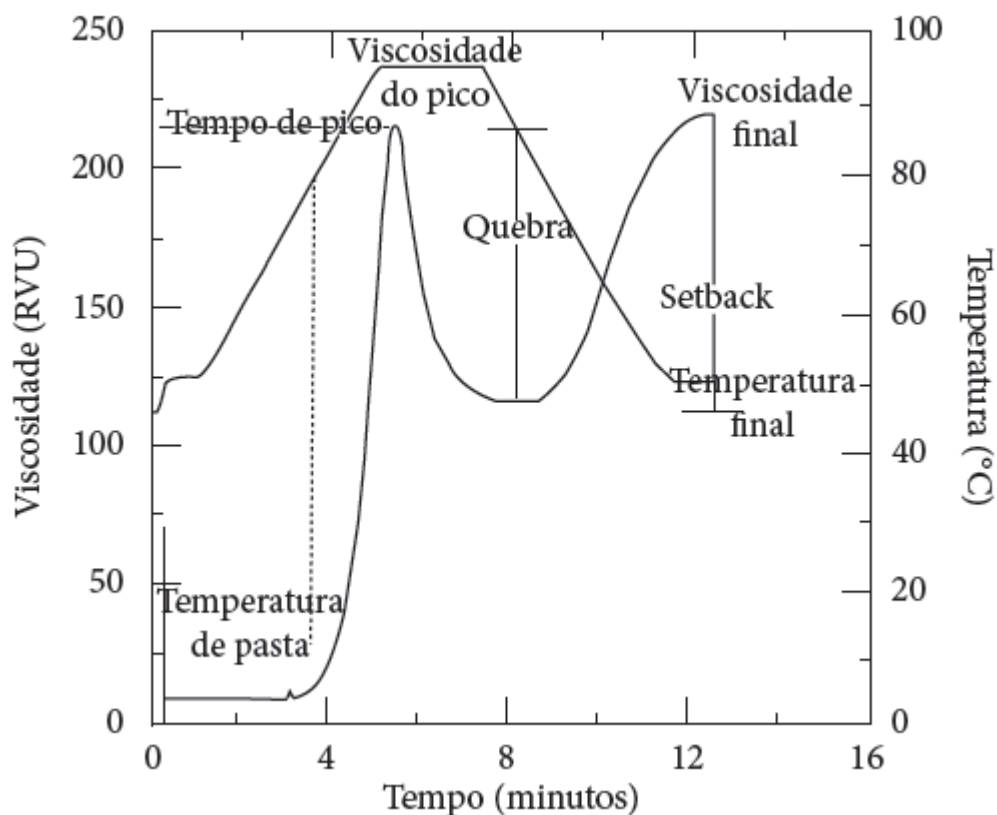
A viscosidade do amido é tradicionalmente avaliada por meio da análise das curvas de viscosidade, denominadas viscoamilogramas construídos através de viscoamilógrafo Brabender e atualmente também através do chamado viscoamilógrafo rápido (rapid visco analyser – RVA) com base na metodologia de Mazurs et al. (1959).

O perfil de empastamento de amidos obtidos através do RVA inclui o pico de viscosidade, tempo para atingir este pico, quebra, viscosidade final, temperatura de pasta e *setback* ou índice de retrogradação que consiste na diferença entre a viscosidade final e a viscosidade mínima (Thomas e Atwell, 1999), como mostrado na Figura 9.

Nesta análise, durante a fase inicial de aquecimento, um aumento na viscosidade é registrado no RVA quando os grânulos começam a inchar. A temperatura na qual a viscosidade começa a aumentar é denominada temperatura de pasta. Neste ponto, polímeros com menor massa molecular, particularmente moléculas de amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos. Um pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também grânulos intactos e o alinhamento molecular dos polímeros solubilizados ainda não ocorreu dentro do campo de atrito do instrumento. Durante a fase de temperatura (95°C) e agitação constantes, os grânulos começam a quebrar, a solubilização dos polímeros continua e o alinhamento

molecular ocorre dentro do campo de atrito do instrumento, causando uma diminuição da viscosidade (Thomas e Atwell, 1999).

Ao ocorrer o resfriamento, alguns polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar, formando um precipitado ou gel ocorrendo um aumento de opacidade da pasta. Este processo é conhecido como retrogradação ou setback (Whistler e Bemiller, 1997).



**Figura 9:** Curva de viscosidade típica do RVA mostrando os parâmetros comumente avaliados.

Fonte: Newport Scientific (1998).

Segundo Marcon et al. (2007), os viscoamilogramas obtidos pelos dois métodos (viscoamilógrafo Brabender ou viscoamilógrafo rápido) refletem as características do amido durante a formação do gel, bem como a resistência do gel às forças mecânicas no

aquecimento e a tendência à retrogradação, mediante análise do comportamento no resfriamento.

Os mesmos autores mencionam que as curvas de viscosidade representam uma importante ferramenta para as observações do comportamento do gel com as condições de processamento da indústria, tais como aquecimento, agitação e resfriamento.

### **1.2.5 Retrogradação do amido**

A retrogradação é o fenômeno que ocorre quando a dispersão de amido gelatinizado é esfriada e as moléculas de amilose se reassociam formando zonas cristalinas (mais ordenadas), com a conseqüente formação de um gel, que sob condições favoráveis pode-se desenvolver em forma cristalina. Esta transformação pode ser acompanhada da expulsão de água das moléculas de amilose, fenômeno conhecido por sinerese (Atwell et al., 1988).

O mesmo autor cita que o nome retrogradação é dado porque o amido volta à sua condição de insolubilização em água fria, fenômeno freqüentemente encontrado em pastas de amido envelhecidas e/ou refrigeradas e/ou congeladas. De acordo com Silva et al. (2006), a análise de resistência a ciclos de congelamento e descongelamento é importante para caracterizar um tipo de amido em termos de sua aplicabilidade em alimentos que devem ser refrigerados e/ou congelados, visto que a liberação de água é geralmente prejudicial à qualidade do produto final.

Considera-se que a retrogradação origina-se da tendência das moléculas ou de grupos de moléculas, de amido dissolvido, se unirem umas às outras através de pontes de hidrogênio, dando formação a partículas de maior tamanho, numa tentativa de cristalização de moléculas grandes e pesadas que, por esta razão, precipitam.

Sob armazenamento à baixas temperaturas, a firmeza do gel formado durante a gelatinização do amido aumenta devido à associação da cadeia do amido na região formada pelas moléculas de amilopectina (Sandhu et al., 2007).

Segundo o mesmo autor, entre os vários fatores que influenciam a retrogradação, os três mais importantes são:

- a concentração de amilose presente;
- o tamanho das moléculas de amilose;
- o estado de dispersão das cadeias lineares.

A retrogradação é inibida quando são introduzidas na molécula de amido grupos substituintes através da acetilação, hidroxietilação ou oxidação por hipoclorito (Barros, 1984).

Geralmente, quanto menor o conteúdo de amilose presente no amido, mais macio é o gel formado, enquanto pasta, por outro lado, as pastas derivadas de amidos de alta amilose convertem-se em um gel bastante rijo (National Starch and Chemical Industrial Ltda, 1995).

A taxa de retrogradação em amidos ácido modificados diminui com o grau da reação de hidrólise (Sandhu et al., 2007).

#### **1.2.5.1 Avaliação da Retrogradação do amido**

A tendência do amido à retrogradação é uma avaliação importante para estimar a estabilidade do gel de amido na estocagem. De maneira geral, amidos que tendem a retrogradar aumentam a opacidade durante a estocagem e por isso a determinação da retrogradação é realizada através da medida da transmitância do gel de amido na estocagem sob refrigeração (Marcon et al., 2007).

O mesmo autor relata que através do método de Albrecht et al. (1960) esta tendência à retrogradação pode ser demonstrada por meio de gráficos da variação da transmitância no tempo de estocagem.

Também a retrogradação pode ser medida através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) através da variação da medida de entalpia ( $\Delta H$ ) de uma amostra de amido submetida ao envelhecimento. Ainda, podem-se obter informações a respeito do processo de retrogradação através dos viscoamilogramas, obtidos pela análise de RVA (item anterior). Neste caso, o índice de retrogradação é dado pela diferença entre a viscosidade mínima, após resfriamento da pasta e a viscosidade final, medida chamada de *setback*.

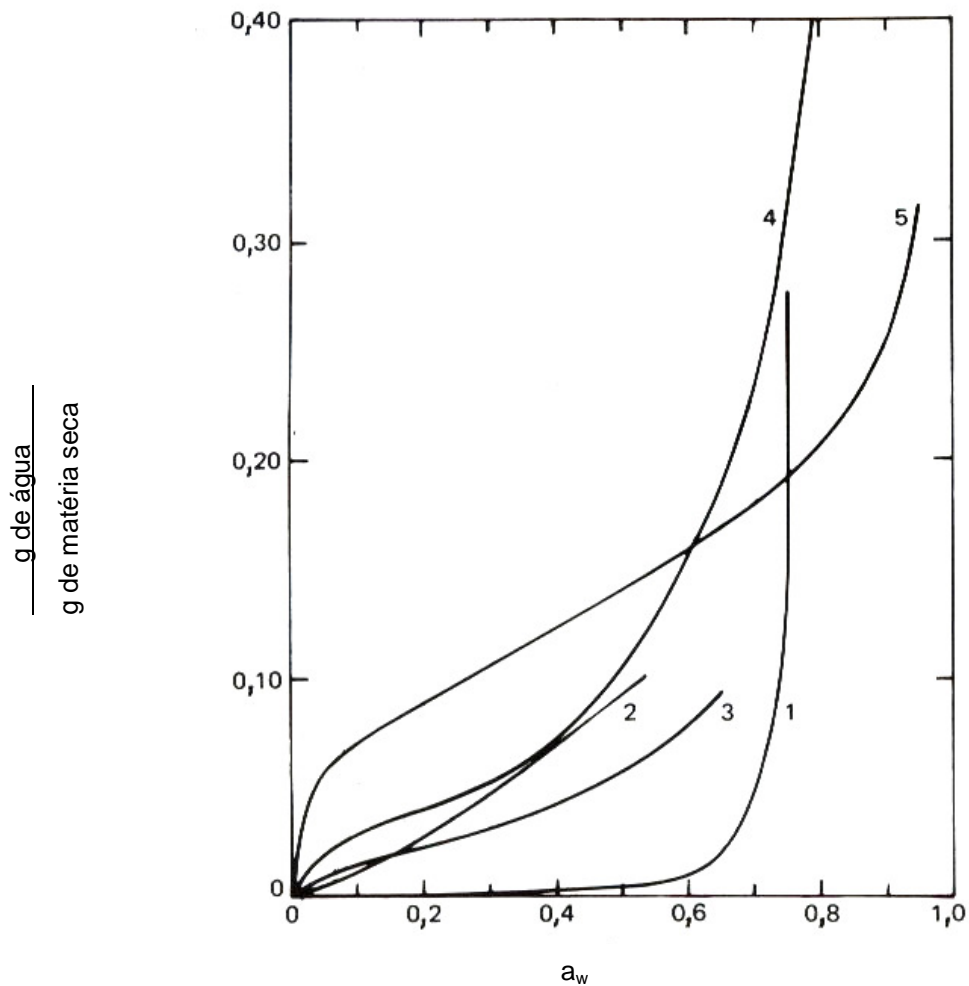
### **1.2.6 Propriedades de Sorção de Água**

A umidade de equilíbrio de um material, em uma determinada temperatura, é definida como a umidade correspondente ao equilíbrio entre as pressões de vapor da água no material e no meio. Esta variável determinará o mínimo valor de umidade que o material pode atingir em um determinado conjunto de condições operacionais, sendo seu valor de fundamental importância na modelagem de processos de secagem (Lehn e Pinto, 2004).

As isotermas de sorção de água são dados que relacionam a quantidade de água em um alimento com sua atividade de água, uma vez alcançado o equilíbrio, à temperatura constante. Constituem uma ferramenta muito valiosa para cientistas e tecnólogos, pois podem ser utilizadas para prever mudanças na estabilidade dos alimentos, para determinar métodos de estocagem, para selecionar embalagens e ingredientes e para o subsequente desenvolvimento e otimização de equipamentos de secagem (Stenel, 2004).

A informação obtida com as isotermas é de utilidade nas operações de concentração e desidratação, na formulação de misturas de alimentos evitando a migração de água entre os diversos ingredientes, na determinação da impermeabilidade requerida no material embalado, na determinação da atividade de água que impede o crescimento dos microrganismos de interesse e na previsão da estabilidade química e física dos alimentos em função do conteúdo de água (Fennema, 2000). A Figura 10 apresenta as isotermas de sorção de diversos alimentos.



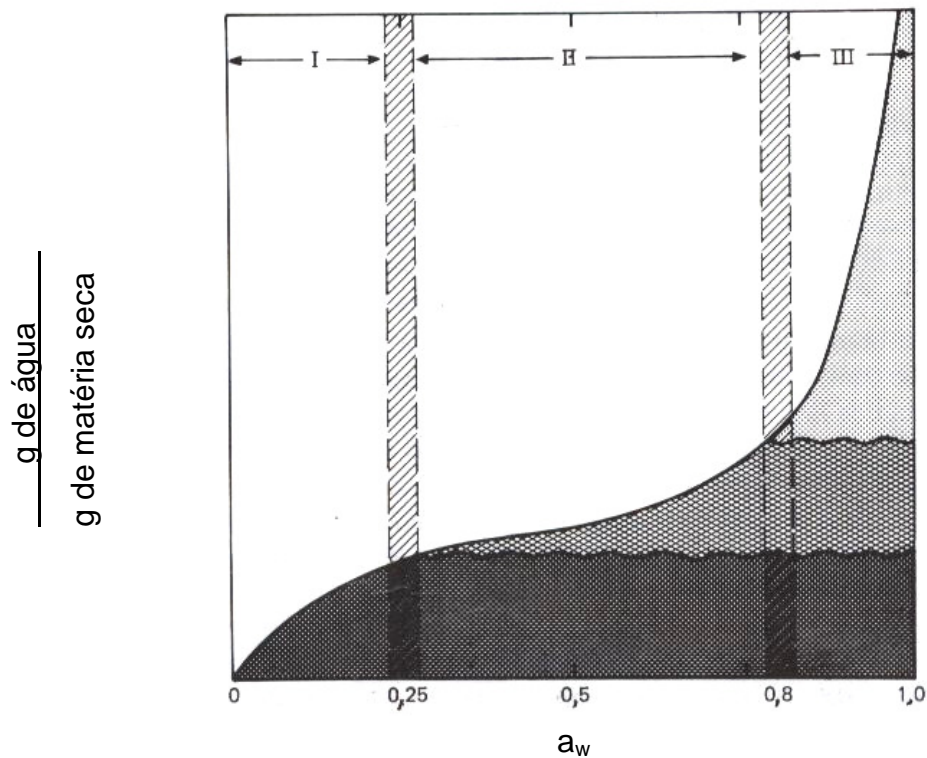


**Figura 10:** Variabilidade de isoterma de sorção de água em materiais alimentícios

(1) Produto com grande quantidade de sacarose; (2) extrato de chicória liofilizado; (3) café; (4) extrato em pó de pâncreas de suíno; (5) amido de arroz

Fonte: Van den Berg e Bruin (1981), citado por Fennema (2000).

Em uma isoterma típica de um alimento, podem-se distinguir três zonas pouco delimitadas (I, II e III) que indicam a forma como a água está ligada ao alimento (Fennema, 2000), o que é apresentado pela Figura 11.



**Figura 11:** Zonas características de uma isoterma de sorção de água de um alimento.

Fonte: Fennema (2000)

As definições dadas a estas zonas, segundo Fennema (2000), são descritas a seguir:

- Zona I representa a água mais fortemente ligada e menos móvel. Corresponde à água da camada monomolecular fixa aos grupos polares de certos compostos. A sua extração é muito difícil, não é congelável e não se encontra disponível para atuar como solvente ou reagente, comportando-se simplesmente como parte integrante do sólido. A entalpia de vaporização desta água é muito maior que da água pura. Corresponde a uma atividade de água ( $a_w$ ) inferior a 0,2 até 0,3. O limite entre as zonas I e II é conhecido como o conteúdo de umidade da monocamada do alimento, que pode ser interpretada

como a quantidade de água necessária para formar uma monocamada sobre os grupos altamente polares e acessíveis de matéria seca.

- Zona II representa a água correspondente às camadas de hidratação dos constituintes solúveis (proteínas, açúcares, sais, etc) e está ligada por pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo ou retida fisicamente em microcapilares de diâmetro inferior a 1  $\mu$ m. O ponto de congelamento e a capacidade solvente da água encontram-se muito reduzidos, sendo que a  $a_w$  está entre 0,2-0,3 e 0,8 aproximadamente. A entalpia de vaporização da água da Zona II é levemente ou moderadamente maior do que a da água pura, o que depende da proximidade da água aos constituintes não aquosos. A água que se adiciona à um alimento com um conteúdo de água no limite das zonas I e II, iniciará processos de dissolução, atuará como solvente e promoverá o inchamento da matriz sólida. O início dos processos de dissolução mobilizará os reagentes, determinando assim uma aceleração da velocidade das reações.
- Zona III representa a maior parte da água dos tecidos frescos, e é a água menos ligada e a mais móvel (molecularmente) dos alimentos. Pode ser facilmente eliminada por diversos procedimentos. Sua retenção é determinada pelo pH e pelas forças iônicas sendo a responsável pela alteração dos alimentos, já que está disponível para o desenvolvimento de microrganismos e para as reações químicas. A  $a_w$  corresponde a valores entre 0,8 e 0,99. A entalpia de vaporização da água da Zona III é essencialmente igual do que a da água pura. Esta água é facilmente congelável.

Ao tratar-se de amidos, Al-Muhtaseb et al. (2004b) comentam que a isoterma é atribuída à pontes de hidrogênio formadas pela molécula de água e os grupamentos hidroxila disponíveis tanto nas regiões amorfas, quanto nas superfícies das regiões cristalinas, sendo que estas últimas exibem uma resistência típica à penetração de solvente. Para os autores, a água afeta a estrutura do grânulo de amido, pois tem um efeito plastificante das regiões

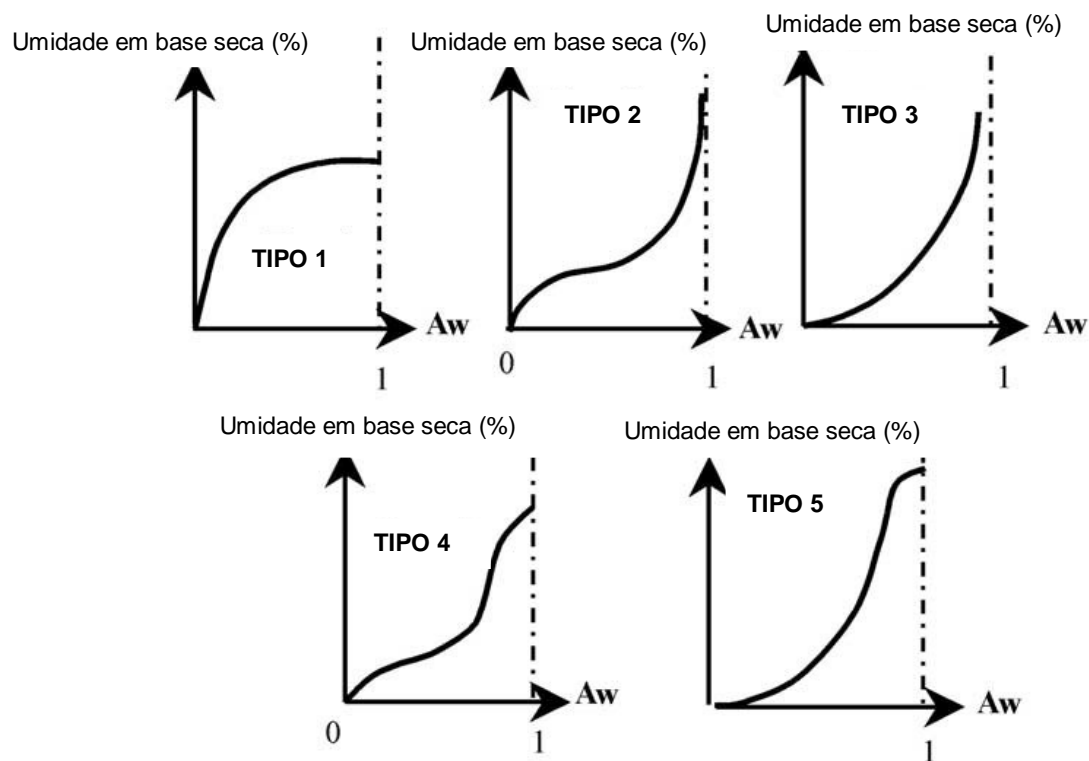
amorfos que é reduzido sob baixos valores de atividade de água, fazendo com que, neste caso, a mobilidade da região amorfa seja restrita. Entretanto, sob valores mais altos de atividade de água a umidade adsorvida causa uma solubilidade do biopolímero com conseqüente redução de cristalinidade e aumento da disponibilidade de grupos polares para estabelecer ligações com a água, gerando a formação de ligações entre a água e o polissacarídeo.

Os métodos utilizados na determinação da atividade de água (para construção das isotermas de sorção de umidade) podem ser classificados em: (a) método gravimétrico, onde o material é colocado em equilíbrio com ar a uma determinada temperatura e umidade relativa  $e$ , então, a umidade do material é medida  $e$ , (b) métodos em que o ar é colocado em equilíbrio com o material a uma determinada temperatura e a umidade relativa do ar é medida. Rao e Pfoest (1978) concluíram que estes últimos são mais simples e mais rápidos, no entanto, o método gravimétrico foi recomendado como método padrão (Speiss e Wolf, 1987).

A temperatura influi diretamente nas isotermas de sorção de um alimento, pois afeta a mobilidade das moléculas de água do mesmo. No entanto, nem sempre as isotermas em diversas temperaturas apresentam separação consistente ao longo de toda a curva. É muito freqüente observar-se um cruzamento entre as curvas em determinados valores de  $a_w$  (entre 0,15 e 0,85). Em baixos valores de atividade de água, a sorção deve-se aos polímeros alimentícios e os aumentos da temperatura tendem a deslocar as curvas para baixo, em relação às abscissas. Para valores de  $a_w$  altas, ocorre a solubilização de açúcares e de substâncias de baixa massa molecular num processo endotérmico, favorecido portanto, pelo aumento da temperatura, de maneira inversa ao que ocorre com os biopolímeros. Como resultado final há um aumento do teor de umidade (Baruffaldi e Oliveira, 1998).

Dependendo na natureza do alimento em questão (pó, cristalino ou amorfo), cinco tipos de isotermas podem ocorrer. Estes cinco tipos foram descritos em 1938, por Brunauer, Emmet e Teller (BET) (Figura 12), onde o eixo das ordenadas representa o teor de água. O Tipo 1 é conhecido como isoterma de Langmuir e é obtido pela adsorção de gás na camada monomolecular em sólidos porosos. O Tipo 2 é a isoterma sigmóide, obtida por produtos solúveis e é representada por uma curva assintótica. O Tipo 3, conhecida como isoterma de

Flory-Huggins, ocorre pela adsorção de um solvente ou substâncias como glicerol, abaixo da temperatura de transição vítrea. A isoterma do Tipo 4 descreve a adsorção gerada por um sólido hidrofílico até a máxima hidratação dos sítios de adsorção e por fim, a isoterma do Tipo 5 é a isoterma de adsorção multicamada de B.E.T (Brunauer, Emmet e Teller), observada pela adsorção de vapor de água, relacionada aos Tipos 2 e 3 (Mathlouthi e Rogé, 2003). As isotermas mais comumente encontradas para produtos alimentícios são as do Tipo 2 e 4.



**Figura 12:** Tipos de isotermas descritos por Brunauer, Emmet e Teller em 1983.

Fonte: Mathlouthi e Rogé (2003)

É grande o número de estudos envolvendo modelos de sorção de alimentos, principalmente nas últimas duas décadas. Nestes trabalhos é apresentada a dependência das isotermas com a temperatura, a estimativa dos calores de sorção e os modelos matemáticos para representar as isotermas (Kaymak-Ertekin e Gedik, 2004). Entre os trabalhos realizados podem ser citados a determinação de isotermas de semolina e farinha

(Erbas et. al., 2005), glúten de trigo (De Jong et al., 1996), café (Cepeda et al., 1999), amido de batata (Wolf e Jung, 1984), amido de milho (Peng et al., 2007), proteína de soja (Cassini et al., 2006), chá (Arslan & Togrul, 2005), abacaxi (Hossain et al., 2001), cogumelos (Shivhare et al., 2004), tomate e cebola (Viswanathan et al., 2003), espécies de amidos (Al-Muhtaseb et al., 2004a), biscoitos (Arogba, 2001), quinoa (Tolaba et al., 2004) e pinhão cru (Cladera-Olivera et al., 2008), entre outros.

Um grande número de equações teóricas, semi-empíricas e empíricas têm sido propostas para a estimativa da umidade de equilíbrio de materiais biológicos. Não existe uma equação geral para isotermas de alimentos em função de que a atividade de água depende da composição dos alimentos e da interação dos diferentes constituintes com a água em condições de equilíbrio termodinâmico (Welti-Chanes & Vergara, 1997). Alguns dos modelos de sorção que foram utilizados neste trabalho são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Modelos de isotermas de sorção comumente utilizados para materiais biológicos alimentícios.

Nome da equação	Equação
BET (Brunauer et al., 1938)	$\frac{aw}{(1-aw).X} = \frac{1}{X_M.C} + \frac{(C-1)aw}{X_M.C}$
GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) (Van den Berg, 1985)	$X = \frac{X_m.C.K.aw}{(1-K.aw) \times (1-K.aw + C.K.aw)}$
Halsey (Halsey, 1948)	$aw = \exp\left(-\frac{A}{X^B}\right)$
Peleg (Peleg, 1993)	$X = k_1.aw^{n_1} + k_2.aw^{n_2}$
Oswin (Lomauro et al., 1985)	$X = A \cdot \left(\frac{aw}{1-aw}\right)^B$
Chung - Pfof (Chung & Pfof, 1976)	$\ln(aw) = -A \cdot \exp(-B.X)$
Henderson (Henderson, 1952)	$(1-aw) = \exp(A.X^B)$
Chirife (Castillo et al., 2003)	$X = \exp[A + B \cdot \ln(C - \ln aw)]$
Smith (Smith, 1947)	$X = A + (B \cdot \log(1-aw))$

Onde:

X é a umidade de equilíbrio (kg água kg<sup>-1</sup> sólidos secos); aw é a atividade de água; X<sub>m</sub> é a umidade de monocamada (kg kg<sup>-1</sup> sólidos secos) e A, B, C, K, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, k, são os parâmetros das equações.

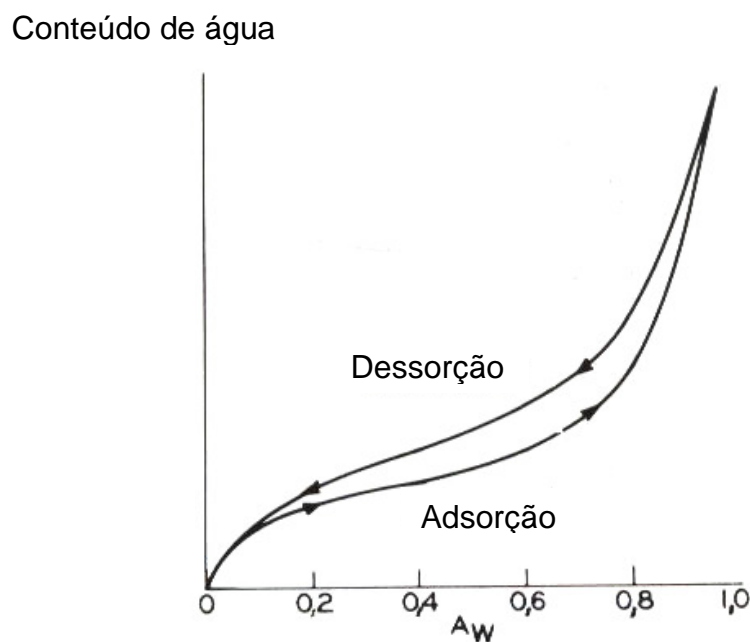
Segundo Al-Muhtaseb et al. (2004b), o modelo de Smith, proposto em 1947, possui muita utilidade na descrição de isotermas de sorção de materiais biológicos como amidos e celulose.

### 1.2.6.1 Histerese

O processo de sorção não é completamente reversível, o que causa uma diferença entre as isotermas de adsorção e as de dessorção. A taxa de mudança de  $a_w$  em uma isoterma de sorção difere dependendo se a umidade é removida do alimento (dessorção) ou se é adicionada ao alimento seco (adsorção). A diferença existente entre os caminhos de adsorção e de dessorção é conhecida como histerese e pode ser observada na Figura 13. Segundo Lahsasni et al. (2003) o fenômeno de histerese ocorre devido à existência de poros de estrutura rígida que são conectados ao seu redor através de pequenos capilares. Durante a adsorção, os capilares começam a encher como resultado do aumento da umidade relativa, enquanto os poros mantêm-se vazios. Quando a pressão parcial de vapor do ar torna-se maior do que a pressão de vapor do líquido do capilar, a umidade se move para o poro. Para a dessorção, o poro é inicialmente cheio de líquido da saturação. Este líquido pode escapar somente quando a pressão do ar do ambiente for menor do que a pressão de ar do líquido de dentro do capilar. A ampla faixa de diâmetros capilares existente no sistema de poros resulta nas diferenças entre a adsorção e dessorção, observada graficamente pelo fenômeno de histerese.

A histerese pode ser grande em alguns alimentos (como o arroz) e é importante na determinação da proteção necessária contra o ganho de umidade (Ordoñez et al., 2005; Fellows, 2006). Para se atingir determinada umidade, é necessária uma pressão de vapor menor se esta umidade é atingida através de um processo de dessorção do que se é atingida por adsorção, devido ao fenômeno de histerese (Baruffaldi & Oliveira, 1998).





**Figura 13: Fenômeno de histerese**

Fonte: Fennema (2000)

### 1.3 FONTES DE AMIDO E PRODUÇÃO MUNDIAL

Amidos nativos comerciais são obtidos de sementes, como milho, milho ceroso, milho com alto conteúdo de amilose, trigo e várias espécies de arroz, e de tuberosas e raízes, como a batata, batata doce e mandioca.

### 1.4 NECESSIDADES DE NOVAS FONTES DE AMIDO

O amido é o agente espessante e gelificante mais utilizado na indústria de alimentos permitindo o desenvolvimento de um grande número de produtos, como sopas, *flans*, molhos, alimentos prontos para o consumo, entre outros (Thebaudin et al., 1998). Nos últimos anos, tem se verificado o esforço de pesquisadores em encontrar novas fontes de amido nativos não convencionais, com propriedades necessárias para a indústria alimentícia, tais como ausência de sinerese, transparência, estabilidade e solubilidade a frio, por

exemplo, (Zhang et al., 2005) pois mesmo o amido nativo sendo um bom estabilizador de textura e regulador em sistemas alimentícios possui limitações como baixas resistência e decomposição térmicas e a alta tendência à retrogradação, que limita o seu uso para algumas aplicações industriais (Hermansson e Svegmark, 1996). Os setores de amido e alimentar estão procurando amidos nativos com propriedades específicas, principalmente para resistir a tratamentos industriais estressantes que deterioram a estrutura do gel de amido, como: temperaturas altas (hidrólise do gel de amido e diminuição da viscosidade), baixas temperaturas (que ocasionam a sinerése do produto), condições de alta acidez (desnaturação da estrutura do gel de amido) e fortes tensões mecânicas (corte, homogeneização, etc.) (Bermudez, 1997).

Para contornar os problemas de funcionalidade dos amidos nativos em uso atualmente é realizada a prática de modificação da molécula do polissacarídeo, com fins de alteração das propriedades funcionais para melhor adequação às necessidades do mercado.

### **1.5 AMIDOS MODIFICADOS**

De amido até glicose, todos os produtos podem passar por reações de modificação e de conversão, conduzindo à produção de moléculas com grau de complexidade variada. Por processos físicos e químicos pode-se alterar o amido nativo, originando um produto com novas propriedades ou corrigindo características indesejáveis em relação a tecnologias já estabelecidas. Muitos destes amidos são modificados junto à própria unidade extratora (Cereda, 1983).

As principais razões que levaram, segundo BeMiller (1997), aos processos de modificação da molécula de amido estão apresentados a seguir.

- Modificação das características de cozimento (gelatinização);
- diminuição da retrogradação;
- redução da tendência das pastas em formarem géis;
- aumento da estabilidade das pastas ao resfriamento e congelamento;
- aumento a transparência das pastas ou géis;

- melhorias na textura das pastas ou géis;
- melhorias na formação de filmes;
- aumento da adesividade;
- adição de grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante.

A modificação da molécula do amido é geralmente ativada através de processos de derivatização, como eterificação, esterificação, ligação cruzada, decomposição (hidrólise ácida ou enzimática e oxidação) ou através de tratamentos físicos do amido, utilizando o aquecimento ou a umidificação, conforme apresentado na Tabela 6. Estas modificações alteram profundamente a gelatinização dos grânulos de amido nativo, assim como seu comportamento quando na forma de pasta e sua retrogradação (Singh et al., 2006).

**Tabela 6:** Tipos de modificação da molécula de amido e técnicas de preparação

<b>Modificação</b>	<b>Tipo</b>	<b>Técnica de Preparação</b>
Física	Aquecimento /Umidificação	1) Aquecimento do amido a temperaturas maiores do que a temperatura de gelatinização, com umidade insuficiente para causar o processo de gelatinização. 2) Anelamento: aquecimento do amido a temperaturas menores do que a temperatura de gelatinização por grandes períodos de tempo.
	Pré-Gelatinização	Processo que utiliza cilindros aquecidos com vapor ( <i>Drum-dryer</i> ) ou sistema <i>spray-dryer</i> .
Conversão	Hidrólise parcial ácida	Tratamento com ácido clorídrico, orto-fosfórico ou sulfúrico.
	Hidrólise enzimática parcial	Tratamento de uma solução aquosa de amido sob temperaturas menores do que a de gelatinização com a utilização de uma ou mais enzimas amilolíticas.
	Tratamento com álcali	Tratamento com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio.
	Oxidação/Bleaching	O tratamento pode ser feito com ácido peracético e/ou peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, cloreto de sódio, permanganato de potássio, persulfato de amônia e dióxido de enxofre.
	Piroconversão (dextrinização)	Tratamento com pirodextrinas, preparado por tostagem do amido acidificado.
Derivatização	Eterificação	Esterificação com óxido propílico.
	Esterificação	1) Esterificação com anidrido acético ou acetato vinílico. 2) Esterificação com anidrido acético e anidrido adípico. 3) Esterificação com anidrido octenilsuccínico.
	Ligação Cruzada	1) A eterificação pode ser feita com: ácido orto-fosfórico, ortofosfato de sódio ou potássio e tripolifosfato de sódio. 2) Esterificação com trimetafosfato de sódio ou oxicloreto de fósforo 3) Combinação dos tratamentos 1 e 2

Fonte: (Singh et al., 2006).

### **1.5.1 Amido modificado por Oxidação**

O processo de modificação do amido por oxidação origina grupos carboxila ou carbonila através do rompimento dos anéis de glicose (Cereda, 1983). A ocorrência da hidrólise acarreta a redução da viscosidade das pastas confeccionadas com este amido, assim como alta claridade da pasta e a menor estabilidade da mesma à temperatura (Singh et al., 2006).

Aparentemente e mesmo ao microscópio, os grânulos de amido não apresentam modificação, embora a coloração seja ainda mais branca do que o amido não tratado, de forma que pode-se cogitar que as reações de oxidação restringem-se às camadas amorfas do grânulo (Cereda, 1983).

O mesmo autor descreve que a reação é obtida pelo borbulhamento do gás cloro através de uma solução de hidróxido de sódio a frio, com temperatura não superior à 30°C. A partir daí, dá-se a formação de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 5 a 10% de cloro ativo, através do qual o amido é tratado. A reação pode ser paralisada a qualquer momento pela adição de um agente neutralizante do cloro, tais como o bissulfito ou o tiosulfato. O pH é mantido entre 8,0 e 10,0 e a concentração de amido ao redor de 20 a 24°Bourné. Após a reação o pH é ajustado entre 3,0 e 7,0 e a suspensão é lavada, a fim de eliminar o sal, e posteriormente seca.

### **1.5.2 Amido esterificado**

Para a obtenção de amido esterificado, trata-se uma dispersão de amido (24% p/p) com anidrido acético ou succínico, por 5 horas à 40°C. Para tanto, esta dispersão deve ter, previamente, seu pH ajustado para 8,0 a 10,0. Quando o grau de substituição desejado for alcançado, a dispersão é neutralizada e o amido é recuperado, lavado e seco (American Maize Products Company, 1996).

### **1.5.3 Amido modificado por ligação cruzada (*Reticulação*)**

O tratamento de ligação cruzada é alcançado quando se adiciona ligações inter e intra-moleculares em localizações randômicas no grânulo do amido, através da utilização de

um agente polifuncional, entre os quais citam-se: ácido orto-fosfórico, ortofosfato de sódio ou potássio, tripolifosfato de sódio, epicloridina, vinil sulfona dipóxido, oxicloreto de fósforo e dialdeídos (Singh et al., 2006; Cereda, 1996). Neste processo, formam-se tanto ligações éter, quanto ligações éster inter-moleculares entre os grupamentos hidroxila da molécula do amido, estabilizando e aumentando a mesma (Acquarone e Rao, 2003). As ligações cruzadas reforçam as ligações normais dos grânulos de amido, proporcionando alta resistência à agitação mecânica e à altas temperaturas. O grânulo, por sua vez, absorve mais água sem romper-se e portanto apresenta picos de elevada viscosidade, sem quedas posteriores (Cereda, 1983).

O amido reticulado, como também é denominado, pode ser preparado, segundo Gall et al. (1977), através da preparação de uma solução aquosa de amido e solução alcalina (pH 12,2), na proporção mássica de 1:1,5 e posterior agitação e aquecimento à 30°C, em reator. À esta solução, segundo o autor, adiciona-se a epicloridina dissolvida na mesma solução alcalina (0,075% p/p) pela parte inferior do reator. Após duas horas, a reação é interrompida através da redução do pH com ácido clorídrico (0,5 N) e a solução centrifugada a 2000 rpm/15 minutos, sendo a fase líquida eliminada. O amido resultante é lavado em água destilada (o dobro em relação ao seu volume) por duas vezes e após decantado e seco (45°C) por 24 horas.

#### **1.5.4 Amido Fosfatado**

O ácido fosfórico pode reagir com o amido formando dois grupos de compostos: o amido mono-éster-fosfato ou o amido di-éster-fosfato. Em ambos os casos é preparado pelo aquecimento de uma mistura de amido ligeiramente úmido com solução de ácido fosfórico, até proporcionar suspensão com 40% de umidade. Após a mistura o amido é seco até 10% e aquecido a 120-170°C por 1 hora, onde o binômio tempo/temperatura proporciona diferentes graus de fosfatação (Cereda, 1983).

Os amidos fosfatados apresentam pasta mais branca, maior pico de viscosidade, grande resistência à retrogradação e estabilidade a ciclos alternados de congelamento e descongelamento, podendo ainda serem empregados como agentes emulsificantes, devido a sua polaridade característica (Stahl et al., 2007).

## **1.5.5 Amidos Hidrolisados**

### **1.5.5.1 Amido Modificado por Hidrólise Enzimática**

Quando na forma gelatinizada, o grânulo de amido é facilmente hidrolisado por enzimas. As principais enzimas utilizadas para este fim são a alfa-amilase (endo-enzima que ataca ligações alfa 1,4), a beta-amilase (exo-enzima que hidrolisa também ligações  $\alpha$ -1,4) e a glucoamilase (hidrolisa ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6) e pode produzir dextrose (Barros et al., 1984).

Para este processo de hidrólise primeiramente se ajusta o pH da dispersão para 5,6 – 5,7 com ácido ou álcali. A partir de então, adiciona-se a enzima (em torno de 0,02%, p/p de amido) e procede-se o aquecimento da dispersão sob temperaturas superiores à de gelatinização. Quando o grau de conversão for alcançado, de acordo com a viscosidade de pasta à quente desejada, o pH é reduzido a 2,0 através da utilização de ácido a fim de desativar a enzima. Este pH é mantido por cerca de 10 minutos, procedendo-se o reajuste do mesmo à neutralidade. O processo finaliza com o cozimento da dispersão de amido que tem por objetivo a desativação da enzima residual (National Starch and Chemical Corporation, 1985).

### **1.5.5.2 Amido Modificado por Hidrólise Ácida**

A hidrólise ácida ocorre quando uma alta concentração de amido (30-40g/100g de sólidos) é tratada com ácido, sob temperaturas inferiores aquelas de gelatinização (30-60°C, variando com a espécie botânica), durante uma ou muitas horas de reação, produzindo a D-glucose ou dextrose, como é conhecida comercialmente. Os ácidos minerais comumente utilizados são o clorídrico e o sulfúrico (Sandhu et al., 2007). A hidrólise do amido depende da consistência do grânulo, acidez do meio, temperatura e duração da hidrólise. A depolimerização via ácido não é seletiva, mas pode-se dizer que a formação de mono e oligossacarídeos dá-se pelo rompimento mais próximo ao final da cadeia. No primeiro estágio da hidrólise a formação de D-glucose, maltose e maltotriose é mais ou menos idêntica (Barros et al., 1984).

No processo lento, o amido é tratado com 7,5% de ácido clorídrico em temperatura ambiente por 7 dias, após é lavado e seco. O tempo pode ser reduzido pelo aumento da temperatura ou da concentração de ácido. Nesta reação, o amido (40-50% p/v) é suspenso em água acidulada (0,05 a 0,5N) e aquecido a 50-55 °C por 2 a 24 horas, sendo, após o tratamento, neutralizado, lavado e seco. Assim preparado é denominado amido de Lintner (Cereda, 1983).

Desde muito tempo é conhecida a cinética da reação da hidrólise do amido. Esta teoria, já imensamente comprovada, diz que a reação inicia pela ação do ácido sobre a região amorfa do grânulo, que é mais suscetível à degradação, etapa esta que ocorre rapidamente (French, 1973). Após a etapa rápida, ocorre a hidrólise da região cristalina, reação com velocidade muito mais lenta. Robin et al. (1975) comprovaram esta teoria através da realização de uma reação de hidrólise ácida de amido de batata, com ácido clorídrico 2,2 mol.l<sup>-1</sup>, a 35°C, por um período de 40 dias. Nesta ocasião, os cientistas observaram que a porcentagem de amido solubilizado em relação ao tempo de hidrólise, mostrou uma curva com dois estágios distintos. O primeiro (0 a 8 dias) com alta velocidade, atribuído à hidrólise da região amorfa, e o segundo (8 a 40 dias), com baixa velocidade, característica da hidrólise da região cristalina. O amido, que no final da reação alcançou uma taxa de 85% de hidrólise, apresentou difractograma de raios-X similar ao nativo, com relação à localização dos picos, porém com maior intensidade, o que demonstrou o ataque preferencial do ácido na região amorfa do grânulo.

A hidrólise ácida diminui a massa molar do polissacarídeo inicial, aumentando, conseqüentemente, o conteúdo dos grupos aldeído livres. O amido hidrolisado via ácido não apresenta mudanças significativas em sua forma granular, tem birrefringência similar e a mesma solubilidade em água fria do amido nativo (Donovam e Berkeley, 1980). Entretanto apresenta menor viscosidade de pasta a quente, maior relação viscosidade fria/ viscosidade a quente (poder de gelificação), maior número de álcali, menor viscosidade intrínseca, menor afinidade com o iodo, incremento na solubilidade em água a temperaturas inferiores à da gelatinização (Radley, 1976) e redução do fenômeno de sinerese (Whistler & Daniel, 1990).

De forma geral, quando o tempo de reação da hidrólise é aumentado, a zona cristalina do amido é aumentada, enquanto o seu conteúdo de amilose é reduzido. Também se pode



comentar que o ataque ácido é conhecido como influenciador do fenômeno de gelatinização do amido (Sandhu et al., 2007) resultando em uma maior temperatura de gelatinização (Radley, 1976) , tanto da temperatura de início da gelatinização( $T_o$ ) quanto da temperatura do pico endotérmico( $T_p$ ) quando comparado à um amido nativo (Jenkins & Donald, 1997).

A partir da reação de hidrólise parcial ácida ou enzimática do amido podem ser obtidas maltodextrinas com baixo valor de dextrose equivalente (DE). O DE é expresso como a porcentagem de hidrólise das ligações glicosídicas e indica o poder redutor (Setser & Racette, 1992).

As maltodextrinas, por sua vez, são, em sua maioria, apropriadas como substitutos de gordura devido às suas propriedades de retenção de umidade, viscosidade e por apresentar *mouthfell* (sensação na boca) similar à gordura (Best, 1991). Como consequência da sua presença, em formulações de bolos, tem-se o aumento no teor de sólidos solúveis, com inibição da cristalização do amido e um maior controle do ponto de congelamento (Candido e Campos, 1996). As maltodextrinas de DE baixa ( $\leq 6,0$ ), possuem propriedades mais próximas ao amido nativo e apresentam baixa umectância, sendo utilizadas de maneira mais efetiva como substitutos de gordura. Já aquelas com altos valores de DE (entre 6,0 e 25,0), geralmente utilizadas em formulações de coberturas para carnes empanadas oferecem aparência atraente e umidade à carne durante o cozimento, características que se assemelham às dos xaropes de milho (Setser e Racete, 1992; Yang e Xu, 2007).

Zambrano e Camargo (1999) em seu estudo com amido de mandioca modificado por hidrólise parcial ácida, constataram que em altas condições de tempo e/ou concentrações de ácido não houve a formação de gel a partir do amido modificado, devido ao alto grau de hidrólise gerado e desta forma o uso como substituto de gordura foi inviabilizado. Salienta-se que estas condições foram encontradas em três combinações de tempo e concentração de ácido: 3,0% de HCl/9 horas, 4,5% HCl/6 horas e 4,5% de HCl/ 9 horas. Entretanto foram citadas patentes (National Starch and Chemical Corporation) onde amidos com DE entre 5,0 e 8,0 formaram géis termorreversíveis de consistência variada (pastosa ou suave cremosa) apropriados para substituir gordura e óleo em alimentos. Desta forma, análises de formação de gel e termorreversibilidade do gel são complementares para a definição dos parâmetros da reação de hidrólise parcial ácida, quando se objetiva esta aplicação.

## **1.6 APLICAÇÕES DO AMIDO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Na indústria alimentícia os amidos e derivados são utilizados como ingredientes, componentes básicos ou aditivos de produtos, visando à melhoria do processo de fabricação, apresentação ou conservação dos mesmos. Os produtos oriundos dos processos de hidrólise, por exemplo, são utilizados na indústria de balas, doces, chocolates, bolos, pastelaria, assim como na indústria de geléias e sobremesas devido às propriedades higroscópicas, anti-cristalizantes (do açúcar) ou adoçantes. Da mesma forma são utilizados os derivados de processos de isomerização do amido (Franco et al., 2002).

### **1.6.1 Aplicação do amido nativo**

No Brasil, dois terços da fécula de mandioca produzida são utilizados na indústria alimentícia, na forma nativa. As principais indústrias/setores alimentícios que utilizam o amido e/ou a fécula na forma nativa segundo Franco et al. (2002) são apresentadas a seguir:

- **Frigoríficos:** a fécula de mandioca é muito utilizada como enchedor cárneo, isto é, um ingrediente que aumenta a CRA (Capacidade de Retenção de Água) e conseqüentemente reduz custo, aumentando o rendimento. As gomas carragenas e as proteínas de soja podem ser utilizadas com a mesma função, produtos altamente competitivos, já que a fécula possui problemas como variação de preço.
- **Indústria de Biscoito:** neste caso, o amido é utilizado na matéria prima (farinha), para padronizar o teor de glúten da mesma, na proporção de 15 a 20% sobre o peso da farinha. Este procedimento confere biscoitos mais leves e mais agradáveis ao paladar.
- **Indústria de Macarrão:** a fécula de mandioca diminui o tempo de cocção das massas frescas e secas. Em geral a substituição das farinhas pela fécula se dá em torno de 25 a 50% (dependendo do teor de glúten), resultando também, em maiores rendimentos, pela CRA da fécula (já comentada) e pelo mantimento do

seu peso, após a etapa de secagem, no caso de confecção de massas secas. Também observa-se que a utilização de féculas em massas reduz a coloração amarelada do produto final e melhora a digestão do mesmo, sendo portanto, bastante indicada ao público infantil e idoso.

- Indústria de Sobremesas: o amido nativo é utilizado como espessante, em mistura com leite, na base de 1 a 2%, dependendo das características do produto.
- Indústria de Iogurtes: utilizado para substituir a gelatina, outro ingrediente utilizado para obtenção de um produto final mais cremoso.
- Indústria de *Snacks*: apenas alguns snacks utilizam o amido nativo na sua composição, normalmente aqueles elaborados com amendoins (“ovinhos” de amendoins ou amendoins japoneses). Para estes produtos utiliza-se cerca de 20 a 35%.
- Indústria da Panificação: a utilização de farinhas mistas na obtenção de produtos de panificação já é bastante difundida em vários países. O uso de fécula de mandioca em farinhas mistas para pães, na proporção de 10 a 15% sobre o peso de farinha oferece as seguintes vantagens: cor mais clara do produto final, retardamento do fenômeno de retrogradação do amido (envelhecimento), maior absorção de água pela massa, miolo com mais umidade, entre outras.
- Indústria de Chocolates e Bombons: muito utilizado na produção de wafers, para diminuir a força do glúten.
- Indústria de Balas e Caramelos: os amidos nativos em pó são usados nos moldes para a produção de balas e caramelos, para absorver a umidade dos moldes.
- Indústria de Sopas: as féculas de batata são preferidas como espessantes de sopas desidratadas, pois têm baixa temperatura de formação de pasta e permite a consistência cremosa procurada para uma sopa depois de cozida. Normalmente utiliza-se um amido com baixa umidade (6 a 12%) para atuar como protetor de umidade para outros elementos desidratados das sopas.

Como pode-se observar existem inúmeras utilizações para os amidos nativos, entretanto pela sua limitação funcional, pois geralmente são insolúveis em água fria, instáveis frente a ciclos de congelamento/descongelamento e muito susceptíveis à retrogradação, o seu uso é bastante limitado (Limberger et al., 2008). A indústria conseguiu contornar estas limitações através dos processos de modificação, e assim o uso do amido estendeu-se bastante, o que é mostrado no item que segue.

### **1.6.2 Aplicações do amido modificado**

As modificações ajudam a estabilizar a viscosidade, aumentar a transparência da pasta e as propriedades emulsificantes. Dependendo do tipo de modificação que é feito na molécula do amido, uma ou mais propriedades funcionais são alteradas, o que favorece a sua aplicação em uma nova gama de produtos, que anteriormente, antes da modificação, não aconteceria.

De maneira geral, estes amidos atuam como estabilizantes e/ou emulsificantes (gerando a estabilidade da emulsão) e proporcionam cremosidade, auxiliando na retenção de umidade e melhorando a claridade da pasta, o sabor, a textura, a vida útil e o valor nutricional de bolos, cookies, recheios, pães, e outros (Lunardini, 2008; Zambrano e Camargo, 1998).

Geralmente são produzidos a partir de amido de batata, milho, aveia, trigo, mandioca e arroz, sendo a origem do amido, o tipo e o grau de modificação fatores determinantes das características físicas de termorreversibilidade, capacidade de gelificar, resistência ao aquecimento, cisalhamento e a pH baixos (Monteiro et al., 2006).

Em bolos e derivados, a utilização de amidos modificados proporciona uma melhora significativa na estrutura celular, no aumento do volume da massa, além de contribuir com propriedades de retenção de umidade no produto final, aumentando sua vida útil sensorial. Isto ocorre devido ao fato de que o envelhecimento (*staling*) que começa assim que o forneamento é completado e se inicia o resfriamento, é retardado pela menor tendência do

amido modificado à retrogradação, fenômeno que tem como consequência a sinerése e o endurecimento precoce do produto (Lunardini, 2005).

Comercialmente estão disponíveis no mercado inúmeros produtos com essas finalidades, alguns nomes são: Frigex (National Starch), Gel "N" Creamy (National Starch), Instant Purê Flo (National Starch), Instant Stellar™, Leanbind (National Starch), Farinex™, Amalean®, Purê-Gel®, Inscosity®, entre outros (Monteiro et al., 2006).

Para o uso como substitutos de gordura especificamente são recomendados amidos com um conteúdo médio de amilose de 20%, com baixos teores de lipídios e proteínas aderidas à superfície, que formam pastas claras e que possuam sabor neutro (Vanderveen e Glinsmann, 1992). Estas características são encontradas, segundo Zambrano e Camargo (1999), em destaque, nos amidos de mandioca, embora o presente trabalho aponte o amido de pinhão como uma forte alternativa para este uso.

A Tabela 7 mostra outras utilizações para diferentes amidos modificados.

**Tabela 7:** Aplicações dos amidos modificados na indústria de alimentos

<b>Indústria</b>	<b>Função do amido</b>	<b>Tipo de Modificação</b>	<b>Características não desejadas do amido nativo</b>
Sorvetes	Espessante Estabilizante	Oxidação, Pré-gelatinização, fosfatação	Não resistem à baixas temperaturas, pois retrogradam mais facilmente, gerando sinerese.
Pudins e Sobremesas	Espessantes	Ligação Cruzada e Pré-gelatinização	Após cozido não apresenta a textura suave recomendada.
Extrusados		Ligação Cruzada Pré-gelatinização	Não resistem à T altas e corte. A quebra dos grânulos deixa a massa grudenta e favorecem a perda da Capacidade de Retenção de Água.
Balas e Caramelos	Agentes Ligantes	Ácido modificados Pré-gelatinizados	Viscosidade à quente muito elevada quando utilizado com altos teores de sólidos.
Sopas e Conservas	Espessantes	Oxidação Ligação Cruzada	Não retém alta umidade após a esterilização
Molhos	Espessante	Ligação Cruzada	Resistência à alta acidez e à ação mecânica durante a homogeneização do molho.

Fonte: Alexander (1996).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Em vista do exposto na revisão bibliográfica realizada, o objetivo deste trabalho foi caracterizar uma nova fonte de amido a partir de semente de *Araucária angustifolia*, através de um estudo detalhado da metodologia de extração do amido de pinhão, das características físico-químicas, funcionais e reológicas do grânulo e de sua modificação estrutural.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma metodologia para a extração do amido de pinhão com alto teor de pureza.
- Avaliar a eficiência da eliminação das proteínas através dos diferentes métodos de extração testados via análise de espectroscopia de fluorescência intrínseca dos sobrenadantes obtidos das lavagens da extração e de determinação de proteínas no amido extraído.
- Avaliar mudanças morfológicas e estruturais do grânulo de amido após a extração com álcali, em diferentes concentrações.
- Avaliar as características físico-químicas do amido de pinhão nativo.
- Determinar as isotermas de sorção do amido de pinhão nativo.
- Realizar a modificação do grânulo de amido do pinhão via hidrólise ácida.
- Otimizar as condições da reação de hidrólise ácida via Metodologia de Superfície de Resposta.
- Avaliar as mudanças reológicas e funcionais do amido de pinhão hidrolisado por ácido, em comparação com o amido nativo de pinhão e milho, assim como com o amido de milho modificado pela técnica estabelecida

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO**

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Engenharia de Processo em Alimentos e Bioquímica e Microbiologia Aplicada, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, no Laboratório de Tecnologia em Engenharia Química (LATEQ) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS, no Laboratório de Reatividade e Catálise do Instituto de Química da UFRGS, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFRGS e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas (SP).

#### **3.2 MATÉRIA PRIMA**

As sementes de *Araucária angustifolia* (pinhão) utilizadas foram adquiridas em mercado local (Porto Alegre, RS), selecionadas, lavadas com água corrente para a retirada das sujidades, secas à temperatura ambiente durante 24 horas e colocadas em sacos de polietileno de 2,0 kg, seladas, e armazenadas em freezer doméstico. Foi utilizado pinhão das safras 2006 e 2007.

O amido de milho nativo utilizado foi da marca comercial Maisena<sup>®</sup>, adquirido em mercado local (Porto Alegre, RS) e armazenado à temperatura ambiente, conforme orientações do fabricante. Teve-se o cuidado de coordenar a data de fabricação do amido de milho com a data de obtenção do amido de pinhão para análises comparativas.



### **3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA A EXTRAÇÃO DO AMIDO E PRODUÇÃO DE FARINHA DE PINHÃO**

#### **3.3.1 Obtenção da farinha de pinhão**

Na elaboração da farinha foi utilizado pinhão da safra 2006, estocado à  $-5^{\circ}\text{C}$  em sacos de polietileno até o uso, conforme item 4.2. As sementes foram descascadas manualmente, sendo também retirada a pele interna e cortadas em rodela uniformes com aproximadamente 5 mm de espessura. Posteriormente, foi realizada a desidratação das rodela de pinhão em secador de bandejas, a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 horas. O produto seco foi moído em moinho de martelos marca Fritsch - Pulverizette, e peneirado em malha Tyler Nº 35. Este foi disposto em embalagens de polietileno contendo aproximadamente 500 gramas, fechada hermeticamente com selador marca Barbie e armazenada à temperatura ambiente até utilização.

#### **3.3.2 Extração do amido**

A extração do amido de pinhão foi feita utilizando pinhão das safras 2006 e 2007, com soluções, através de três protocolos diferentes, a fim de determinar o melhor método a ser utilizado. No primeiro protocolo, o pinhão descascado foi desintegrado em liquidificador doméstico com adição de água na proporção 1:2, por 1,5 minutos. Após a desintegração, o material foi passado por peneiras de 60 e 200 *mesh*, sendo o permeado lavado quatro vezes em água, a  $5^{\circ}\text{C}$ . Após cada lavagem, uma etapa de decantação (por 30-40 minutos), sob refrigeração ( $5^{\circ}\text{C}$ ), foi realizada. Finalmente, o amido extraído foi seco em estufa a  $40^{\circ}\text{C}$ , por 3 dias, conforme realizado por Leonel et al.(2003) e após resfriamento foi passado por moinho de martelos marca Fritsch - Pulverizette, com tamanho de malha Tyler Nº 35, à velocidade de 8000 rpm. Para os outros dois protocolos de extração realizados, o procedimento foi idêntico ao descrito por Leonel et al. (2003), com exceção de que, em um deles, 0,1M de NaOH (Merck) foi adicionado tanto à água da extração, como à água das lavagens e, no outro, 0,05 M de NaOH.

### **3.4 AVALIAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO**

A fim de avaliar qual o protocolo mais indicado para a obtenção do amido de pinhão, considerando a pureza da amostra, realizaram-se as análises indicadas a seguir.

#### **3.4.1 Rendimento do método de extração em amido**

O índice de aproveitamento da semente de pinhão foi calculado de acordo com a equação 4.1, a partir de 400 g sementes de pinhão com casca. O rendimento do amido de pinhão após a extração (item 4.3.1) foi calculado de acordo com a equação 4.2, para os três protocolos de extração testados, a partir da semente sem casca.

$$\text{Índice de aproveitamento da semente (\%)} = \frac{\text{Massa do Pinhão sem Casca (g)}}{\text{Massa do Pinhão com Casca (g)}} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\text{Rendimento do pinhão em amido (\%)} = \frac{\text{Massa do Amido Seco após Extração (g)}}{\text{Massa do Pinhão sem Casca (g)}} \times 100 \quad (4.2)$$

#### **3.4.2 Análises Físico-químicas**

Todas as análises físico-químicas descritas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como valor médio  $\pm$  desvio padrão.

##### **3.4.2.1 Umidade**

O conteúdo de umidade foi calculado através da perda de massa após o aquecimento da amostra a 105 °C de acordo com os métodos padrão de análises AOAC (1990).

#### **3.4.2.2 Proteína**

A quantificação da proteína residual foi determinada pelo método Kjeldahl de acordo com o protocolo 2055 da AOAC (1990). Para isso a amostra foi digerida com solução sulfocúprica, destilação utilizando hidróxido de sódio e titulação com ácido sulfúrico. O fator de correção utilizado foi %N x 5,75.

#### **3.4.2.3 Lipídios**

Os lipídios (matéria graxa) foram extraídos em um extrator Soxhlet de acordo com AOAC (1990), utilizando éter de petróleo para a extração.

### **3.4.3 Espectrometria de Fluorescência**

A espectroscopia de fluorescência intrínseca dos sobrenadantes, obtidos após cada lavagem, foi realizada a fim de determinar a quantidade de proteína removida durante a extração e, assim, avaliar a pureza do amido extraído. As análises foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi F-4500) operando entre 250 e 650 nm e usando excitação, no comprimento de onda de 350 nm. Os sobrenadantes obtidos durante após as lavagens foram utilizados sem diluição utilizando uma célula de quartzo óptica, de acordo com Thys et al. (2008).

### **3.4.4 Microscopia eletrônica de varredura**

As características e mudanças morfológicas do amido, obtido após as diferentes formas de extração (água e álcali) e da farinha de pinhão foram detectadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio JEOL JSM-6060 (JEOL, Tóquio, Japão) (Laboratório de Microscopia Eletrônica - UFRGS), operando a 8kV. As amostras secas foram afixadas em suportes de cobre, através de uma fita adesiva dupla-face e posteriormente metalizadas com ouro (Au), metodologia empregada por Thys et al. (2008). As fotomicrografias foram obtidas através de um aumento de 2000 e 4000 vezes.

### 3.4.5 Microscopia de Força Atômica (MFA)

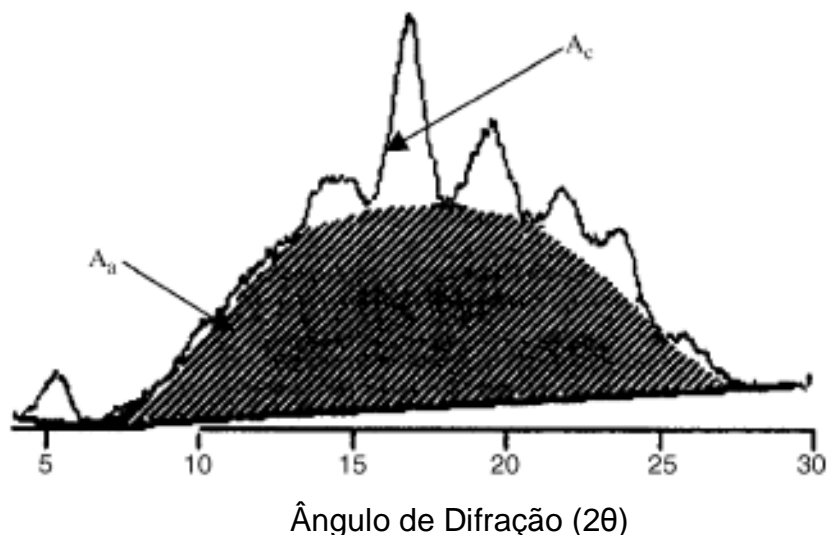
A análise de MFA foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, São Paulo). Alíquotas de amido de pinhão em suspensão (5 mg/ml) foram depositadas sobre placas e secas à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram analisadas em microscópio (DI Nanoscópio III) operando em modo não-contato. As imagens foram capturadas no ar, à temperatura ambiente, com 40% umidade relativa, conforme realizado por Thys et al. (2008), recomendado por Horcas et al.(2007).

### 3.4.6 Difração de raios- X (DRX)

Os experimentos de difractometria de raios-X foram utilizados a fim de estimar as frações cristalinas e amorfas em cada amostra de amido extraído através das diferentes formas (água, álcali a 0,1M e a 0,05M). A análise também foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, São Paulo), de acordo com Thys et al. (2008).

O índice de cristalinidade das amostras foi quantitativamente estimado através do método de Nara e Komiy (1983), através de plotagem computacional (realizada pelo próprio software do equipamento) de uma curva conectada à linha base dos picos do difractograma (Figura 13), onde a área acima da curva é a porção cristalina e a área entre a curva e a linha base linear conectada aos pontos de intensidade  $2\theta$  igual  $30^\circ$  e  $2\theta$  igual  $4^\circ$  é a fração amorfa. A áreas dos picos do difractograma ( $A_c$ ), assim como a área compreendida entre a curva sólida e a linha base ( $A_a$ ) foram integradas utilizando o software Smadchrom (Morgan and Kennedy Research, Australia). A razão entre estas áreas é o índice de Cristalinidade, calculado pela equação 4.3. Estas áreas são indicadas na Figura 14.

$$X_c = \frac{A_c}{(A_c + A_a)} \quad (4.3)$$



**Figura 14: Cálculo do índice de cristalinidade, onde  $A_a$  é a área referente a fração cristalina do polímero e  $A_c$ , a área referente a fração amorfa do polímero.**

Fonte: Shujun et al. (2007)

### **3.5 CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO NATIVO EXTRAÍDO**

É conhecido como amido nativo, o polissacarídeo extraído através do uso de água ou outro solvente, que não tenha sido submetido à processos que modifiquem a sua molécula, estruturalmente.

Neste trabalho, o amido nativo refere-se ao polissacarídeo extraído com água (processo descrito no item 4.3.2), com o qual foram realizadas as análises a seguir.

#### **3.5.1 Amido**

A quantificação do amido no material obtido foi realizada através de metodologia para análise de amido do Instituto Adolfo Lutz (1985), a fim de determinar o teor de amido do material extraído e conseqüentemente a sua pureza. A análise tem como princípio a

detecção da glicose (pelo método de Lane-Eynon) produzida através de hidrólise da molécula de amido presente na amostra, em autoclave (pH 4,75, 30 minutos).

### **3.5.2 Amilose**

A quantidade de amilose presente no amido do pinhão nativo foi detectada através do método espectrofotométrico, recomendado por Williams et al. (1970), viabilizado pela reação da amilose com o iodo, que forma um complexo de coloração azulada. Para tanto 20 mg de amido foram dissolvidos em 10 ml de KOH (0,5 M), sendo a dispersão transferida para um balão volumétrico de 100 ml, sendo o volume do mesmo completado com água. Uma alíquota de 10 ml da dispersão foi pipetada em balão volumétrico de 50 ml, onde foram adicionados 5 ml de HCl (0,1M), seguidos de 0,5 ml de reagente iodina. O volume foi diluído em 50 ml e a absorbância foi medida à 625 nm. A medida da amilose foi determinada a partir de uma curva padrão usando misturas de amilose e amilopectina comerciais.

### **3.5.3 Cinzas**

O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração do material em mufla a 550 °C, de acordo com a AOAC (1990), método n° 923.03.

### **3.5.4 Fibra bruta**

O conteúdo de fibras foi determinado de acordo com a AOAC (1990), método n° 962.09, através de digestão ácida e básica da amostra desumidificada e desengordurada.

### **3.5.5 Microscopia ótica**

A microscopia ótica do amido de pinhão foi realizada em microscópio ótico marca Olympus CX 40 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japão). As amostras foram preparadas através da dispersão do amido em água, de acordo com Stahl et al. (2007), e colocadas sobre lâminas de microscópio cobertas com uma gota de solução de glicerina, para evitar a sua evaporação. A seguir foram cobertas por uma lamínula e após uma hora de repouso foram observadas ao microscópio sob luz polarizada.

Uma câmera não digital, acoplada ao microscópio, foi utilizada para capturar a imagem, utilizando um filme colorido comercial (Fujifilm, 135 mm, Asa 100). Para avaliar as mudanças geradas no grânulo de amido, pelo seu aquecimento, a lâmina contendo a amostra foi colocada sob uma chapa com aquecimento controlado, onde foi possível gerar uma rampa de aquecimento (35 – 80 °C). As fotomicrografias foram capturadas sob um aumento de 200x.

### **3.5.6 Determinação das isotermas de sorção**

Os dados de sorção foram determinados utilizando o método gravimétrico, recomendado como método padrão (Speiss e Wolf, 1983), que consiste em colocar as amostras em ambientes com umidades relativas conhecidas e constantes, deixando-as até atingir o equilíbrio e determinando-se nessa condição a umidade das amostras. Para tanto, utilizaram-se soluções salinas saturadas no interior de frascos hermeticamente fechados, que, sob determinada temperatura, conferiam ao interior de cada frasco uma umidade relativa de equilíbrio conhecida. Os sais utilizados foram os mesmos que os empregados por Cassini et al., (2006) e Cladera-Olivera et al. (2008): cloreto de lítio, acetato de potássio, cloreto de magnésio, carbonato de potássio, nitrito de potássio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de bário e sulfato de cobre, cujos valores de umidade relativa para cada sal a cada temperatura são apresentados na Tabela 8. Frascos de vidro contendo as amostras de amido foram colocados em triplicata no interior dos recipientes hermeticamente fechados, contendo na sua parte inferior a solução saturada, e estes foram acondicionados em câmara termostática com circulação interna de ar (marca Tecnal, modelo TE-381 com faixa de operação entre – 10°C e 50°C ± 0,3°C). Para evitar o crescimento de fungos nos recipientes, em ambientes cuja umidade relativa era superior a 50%, foram colocados, nos seus interiores, dois pequenos frascos contendo 1 ml de tolueno. Após duas semanas, foram pesadas as amostras a cada 5 dias até a verificação de que não existia mudança significativa no peso (<0,0005 g) considerando que as amostras tinham chegado ao equilíbrio. Ao alcançar o equilíbrio, a umidade das amostras foi determinada. Os experimentos de sorção foram realizados nas temperaturas de 10, 20, 30 e 40°C.

**Tabela 8:** Soluções salinas saturadas utilizadas na determinação das isotermas de adsorção de amido de pinhão.

Sal	Umidade Relativa (%)			
	10°C	20°C	30°C	40°C
LiCl	0,113	0,112	0,112	0,110
CH <sub>3</sub> COOK	0,235	0,230	0,220	0,210
MgCl <sub>2</sub>	0,335	0,332	0,325	0,317
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,440	0,430	0,430	0,430
NaNO <sub>2</sub>	0,675	0,655	0,635	0,615
NaCl	0,760	0,755	0,755	0,755
KCl	0,870	0,853	0,835	0,820
BaCl <sub>2</sub>	0,914	0,907	0,900	0,893
CuSO <sub>4</sub>	0,978	0,973	0,968	0,962

Fonte: Young (1976).

### 3.5.7 Determinação das propriedades termodinâmicas

Os dados experimentais de sorção obtidos foram ajustados aos modelos apresentados na Tabela 8 utilizando o módulo de análises de regressão não linear do programa *Statistica 7.0* (Statsoft, USA, 1995). Foram empregados dois métodos de otimização (Gauss-Newton e Lenvenberg-Marquardt) e valores iniciais diferentes, para os parâmetros da equação, para garantir a convergência. Para avaliar a qualidade do ajuste de cada modelo, foram utilizados o coeficiente de regressão ( $r^2$ ) e o erro médio relativo (EMR), definido como:

$$EMR = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|X_{ei} - X_{pi}|}{X_{ei}} \quad (4.4)$$

onde  $X_e$  e  $X_p$  são, respectivamente, a umidade de equilíbrio experimental e predita pelos modelos (kg água. kg<sup>-1</sup> sólidos secos) e, N, o número de pontos experimentais. Geralmente é considerado que valores de EMR menores do que 10% indicam um ajuste adequado (Lomauro et al., 1985).



### 3.5.7.1 Cálculo da entalpia e da entropia diferenciais de sorção

A entalpia diferencial de sorção foi calculada através da seguinte equação, derivada da equação de Clausius-Clapeyron (Tsami, 1991):

$$\Delta h = -R \left[ \frac{\partial \ln(aw)}{\partial (1/T)} \right]_X \quad (4.5)$$

Cuja solução é:

$$(\ln aw)_X = -\frac{\Delta h}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4.6)$$

Onde  $aw$  é a atividade de água,  $\Delta h$  a entalpia diferencial molar de sorção ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ),  $\Delta S$  a entropia diferencial de sorção ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $R$  a constante universal dos gases ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $X$  a umidade de equilíbrio ( $\text{kg água kg}^{-1}$  sólidos secos) e  $T$  a temperatura absoluta (K).

As entalpias ( $\Delta h$ ) e entropias ( $\Delta S$ ) diferenciais de sorção foram calculadas através da Eq. (4.5) utilizando a análise de regressão linear onde os valores de  $aw$  e  $T$ , para cada nível de  $X$  foram obtidos a partir do modelo de isoterma de sorção que melhor se ajustou aos dados. Esse procedimento foi repetido para diferentes umidades a fim de determinar a dependência de  $\Delta h$  com a umidade de equilíbrio. Considerou-se que  $\Delta h$  não varia com a temperatura e requer dados de modelos de isotermas no mínimo em três temperaturas (Tsami, 1991).

### 3.5.8 Sinerese do amido de pinhão nativo

O grau de sinerese foi determinado pelo método descrito por Biliaderis (1982) através da determinação da água exsudada de uma pasta de amido a 5% preparada por aquecimento a  $95^\circ\text{C}$ , com agitação por 30 minutos. Após a formação do gel do amido, as

mesmas foram armazenadas em sacos plásticos selados, a fim de estabelecer um equilíbrio entre o gel e o exsudado. As medidas foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 5°C, através da pesagem da massa da água liberada ao verter os sacos onde as amostras se encontravam. Também foi realizada essa análise para o amido de milho nativo.

A quantidade de água exsudada foi expressa como a porcentagem de peso do sobrenadante que se encontra por cima da superfície da suspensão, de acordo com a equação 4.7.

$$\% \text{ Sinerese} = \frac{\text{Massa de Água do Sobrenadante (g)}}{\text{Massa total da Pasta (g)}} \times 100 \quad (4.7)$$

### **3.6 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO AMIDO DE PINHÃO NATIVO**

#### **3.6.1 Modificação do amido de pinhão via hidrólise ácida para obtenção de um substituto de gordura**

A reação de hidrólise foi realizada utilizando o método proposto por Mun e Shin (2006) com algumas modificações (descritas abaixo) utilizando o amido de pinhão extraído com água. O método consiste na imersão do amido (10 g) em ácido clorídrico em solução (40 ml), sob temperaturas inferiores à gelatinização do amido (45 a 55°C) e agitação mecânica (150 rpm). Após a hidrólise, a dispersão foi ajustada a pH 5,5 com NaOH (1 mol.l<sup>-1</sup>), sob agitação. A seguir a dispersão foi centrifugada (2000 rpm/10 min/25°C), e realizada uma lavagem com água (40 ml), seguida de nova centrifugação para recuperar o amido. O sobrenadante obtido foi ajustado a pH 7,5 com NaOH (1 mol.l<sup>-1</sup>) para determinação do equivalente de dextrose (DE) e o amido foi seco em desidratador de circulação de ar forçado a 45°C, durante 3 dias, até a umidade alcançar 11-13%.

Em reações de hidrólise parcial ácida normalmente se utilizam condições baixas de temperatura e concentração de ácido, com tempos de reação muito longos, em torno de 30 dias (Mun e Shin, 2006). Como forma de obter uma maior aplicabilidade do processo de

modificação ácida em níveis industriais, buscou-se estudar, primeiramente, o tempo de reação, em uma faixa de 3 a 9 horas, utilizando condições de 37°C e 2,2 mol.l<sup>-1</sup> realizado. Este estudo teve por finalidade determinar o tempo onde é possível gerar uma hidrólise que leve à formação de maltodextrinas com 2,0 <DE≤ 6,0, valor este recomendado por Yang e Xu (2007) para que o amido modificado tenha aplicabilidade como substituto de gordura em alimentos.

Os níveis de temperatura e concentração de HCl foram posteriormente estudadas através de planejamento experimental, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) tendo como resposta o teor de açúcares redutores (DE), a taxa de hidrólise e as análises de formação, fusão e termorreversão do gel (itens 4.6.1.2, 4.6.1.3 e 4.6.1.4).

Para tanto foi empregado um planejamento experimental que consistiu em um experimento fatorial 2<sup>2</sup> com um ponto central, conduzido através de um desenho completo aleatório (DCA), onde os fatores estudados foram temperatura e concentração de ácido clorídrico. A Tabela 9 apresenta os níveis de cada fator e o total de tratamentos. O tempo empregado foi obtido no experimento anterior.

**Tabela 9:** Matriz e níveis dos fatores estudados e total de tratamentos realizados

Tratamento	Valores Codificados		Valores Reais	
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Concentração HCl (mol. l <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	30	1,2
2	+1	-1	44	1,2
3	-1	+1	30	3,2
4	+1	+1	44	3,2
5	0	0	37	2,2

Os níveis foram escolhidos a partir dos dados empregados por Mun e Shin (2006), Shujun et al.(2007) e Kim et al.(1996), que relatam que a faixa de temperatura de 30 a 44°C e de concentração de ácido de 1,2 a 3,2 mol.l<sup>-1</sup> são as mais indicadas para o processo de

hidrólise ácida. O conhecido amido de “Lintner” é produzido sob estes parâmetros de hidrólise (2,2 mol.l<sup>-1</sup> e 30-40°C) (Mun & Shin, 2006).

A resposta, teor de açúcares redutores foi determinada através da análise de dextrose equivalente.

A equação da superfície de resposta foi predita a partir da equação 4.8:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12} x_1x_2 \quad (4.8)$$

Onde:

Y é a concentração de açúcares redutores (DE, em mg.ml<sup>-1</sup>),

b<sub>0</sub>, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> e b<sub>12</sub> são os coeficientes da equação

x<sub>1</sub> é o valor codificado do fator temperatura, x<sub>2</sub> é o valor codificado do fator concentração de ácido clorídrico e x<sub>1</sub>x<sub>2</sub> é a interação entre estes fatores.

A análise de regressão foi realizada através do software *Statistica*, versão 7.0 (*StatSoft*).

Para fins de comparação da susceptibilidade do amido de pinhão nativo à reação de hidrólise ácida, foi realizada também a modificação via hidrólise ácida do amido de milho comercial (Maisena<sup>®</sup>). Os parâmetros utilizados na reação de hidrólise (concentração de ácido e temperatura) foram os valores ótimos da reação de hidrólise para o amido de pinhão, após a realização do planejamento fatorial.

### **3.7 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS E FUNCIONAIS REALIZADAS NO AMIDO MODIFICADO DE PINHÃO**

#### **3.7.1 Dextrose Equivalente (DE)**

O equivalente de dextrose (DE) é um termo convencional utilizado para descrever o grau de hidrólise do amido e é expresso como a porcentagem de açúcares redutores presentes (American Maize Products Company, 1992). A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitro-salicílico (DNSA) (Miller, 1959). O sobrenadante obtido após recuperação do amido hidrolisado, foi ajustado à pH 7,5 com NaOH 1 mol.l<sup>-1</sup> (ver item anterior) e analisado em espectrofotômetro (Shimadzu U-1100) com comprimento de onda de 540 nm. O teor de dextrose equivalente foi obtido através de uma curva padrão previamente realizada através de soluções de diferentes concentrações de glicose (mg glicose/ml solução) (Anexo 1).

#### **3.7.2 Testes de Formação, Fusão e Termorreversão do Gel**

A formação de gel foi determinada seguindo a metodologia descrita por National Starch and Chemical Corporation (1985). Amostras de amido (8g em base seca), previamente secos em estufa de circulação de ar (42°C, por 72 horas), foram dispersas em 24 ml de água, em béquer de 50 ml, sendo anotado a massa total. A dispersão foi aquecida em chapa metálica à 95-100°C, por 15 minutos, novamente pesada e levada ao peso inicial com água destilada.

A dispersão foi resfriada a temperatura ambiente e deixada sob refrigeração (4-5°C) por 18 horas. Após este período o béquer foi deixado sob temperatura ambiente por 2 horas e foi observado se ocorreu a formação de gel, através da solidificação da amostra e não somente do aumento de sua viscosidade.

O gel obtido foi fundido em banho Maria a 100°C, sob agitação, segundo procedimento citado por Richter et al.(1973). A mudança de consistência foi observada visualmente, e com o auxílio de um termômetro foi apontada a temperatura na qual o gel se apresentou totalmente fundido, considerada como o ponto de fusão do gel.

O gel fundido foi deixado resfriar a temperatura ambiente e a seguir estocado à 4-5°C, durante 18 horas. A formação de gel foi observada, após 1 hora do material estocado ficar à temperatura ambiente (Zambrano e Camargo, 2001a).

### 3.7.3 Porcentagem de Hidrólise

A porcentagem de hidrólise foi calculada de acordo com o método de Robin et al. (1975), citado por Mun e Shin (2006), segundo a equação 4.9:

$$\text{Porcentagem de Hidrólise (\%)} = \frac{\text{Açúcar Redutor do Sobrenadante (g)} \times 0,9}{\text{Quantidade de amido total (g)}} \times 100 \quad (4.9)$$

## 3.8 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E TÉRMICAS DO AMIDO DE PINHÃO NATIVO E MODIFICADO APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA

Com intuito de avaliar e comparar a provável mudança de propriedades funcionais adquirida pelos amidos de pinhão nativo, através da reação de hidrólise ácida, na melhor condição obtida após a avaliação do experimento fatorial, foram realizadas as análises a seguir. Essas análises também foram realizadas com os amidos nativo e hidrolisado de milho (modificado nas mesmas condições que o amido de pinhão). Para as análises descritas abaixo, os amidos modificados foram secos em estufa, por 72 horas e triturados em moinho de martelos (Fritsch - Pulverizette).

### 3.8.1 Porcentagem de Recuperação do Amido após a Hidrólise Ácida

A porcentagem de recuperação do amido após a modificação por hidrólise ácida foi calculada de acordo com Shujun et al. (2007), da seguinte forma:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{W_a}{W} \times 100 \quad (4.10)$$

Onde  $W_a$  é a massa do amido (em base seca) após a hidrólise ácida e posterior secagem e  $W$  é a massa do amido em base seca antes da reação de hidrólise.

Para isso, o amido antes e depois da hidrólise foi seco em estufa á 105°C por 3 dias. Após este período, este foi transferido para um dessecador para que resfriasse e em seguida pesado.

### **3.8.2 Teste de Formação, Fusão e Termorreversibilidade do Gel**

A formação, fusão e termorreversibilidade do gel foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 4.7.2.

### **3.8.3 Retrogradação**

A tendência à retrogradação do amido foi analisada pelo método de Albrecht et al. (1960). Suspensões com 0,2% de amido em água (pH 6,5) foram gelatinizadas por aquecimento à 95°C por 30 minutos e posteriormente armazenadas à 5°C. O monitoramento da tendência à retrogradação foi realizado por medida diária da transmitância (espectrofotômetro modelo Shimadzu U-1100), empregando-se a água destilada para ajustar o 100% de transmitância do aparelho. As medidas de transmitância foram realizadas por um período de 31 dias. A tendência a retrogradação foi demonstrada por meio de gráfico da variação da transmitância no tempo de estocagem.

### **3.8.4 Estabilidade ao Congelamento e Descongelo**

A avaliação da estabilidade do gel de amido ao congelamento e descongelamento foi realizada através do método de White et al. (1989). Para isso, uma suspensão de amido em água a 5% foi aquecida a 95°C com agitação, por 30 minutos. A seguir 20 g do gel obtido foram colocados em um tubo de centrífuga, tampado hermeticamente e submetido a 6 ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento. Cada ciclo consistiu do congelamento a -18°C em um congelador por 24 horas e o descongelamento em banho termostático a 30°C por 90 minutos. Após o último ciclo, o gel foi centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos.

O sobrenadante foi pesado e a extensão da sinerese, calculada conforme a equação 4.7. Os valores foram expressos em porcentagem de água exsudada, em relação à massa inicial da pasta.

### 3.8.5 Poder de Inchamento (PI)

O poder de inchamento foi determinado segundo metodologia descrita na AACC (2002). Para tanto, suspensões aquosas de 8 g de amido (base seca) em 100 ml de água destilada foram submetidas a diferentes temperaturas (25, 50, 60, 70, 80 e 90°C), em banho termostático por 30 minutos e com agitação a cada 5 minutos. O material resultante foi centrifugado a velocidade de 2500 rpm por 5 minutos. A massa do resíduo da centrifugação (gel) foi coletada. O sobrenadante foi utilizado reservado para a análise de índice de solubilização (4.8.6), sendo o poder de inchamento calculado através da equação 4.11.

$$\text{Poder de Inchamento (PI)} = \frac{\text{Massa do Gel (g)}}{\text{Massa da Amostra em base seca (g)}} \quad (4.11)$$

### 3.8.6 Índice de Solubilização (IS)

O índice de solubilização também foi determinado segundo metodologia descrita na AACC (2002). Para tanto uma alíquota de 10 ml do sobrenadante proveniente da centrifugação descrita no item 4.8.5 foi colocada em placas de petri e seca em estufa à 105°C, até atingir massa constante. Essa massa foi pesada e a % do índice de solubilização foi calculada segundo a equação abaixo, onde a massa da amostra em base seca é a mesma descrita no item anterior.

$$\% \text{ Índice de Solubilização (IS)} = \frac{\text{Massa Final (g)}}{\text{Massa da Amostra em Base Seca (g)} \times 10} \times 100 \quad (4.12)$$



### 3.8.7 Microscopia eletrônica de varredura

As características morfológicas do amido do pinhão e milho modificados foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com o item 4.4.4.

### 3.8.8 Determinação da viscosidade de pasta

Para a determinação da viscosidade de pasta foi utilizado o Analisador Rápido de Viscosidade (Rapid Viscosity Analyser, RVA, Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia). As amostras de amido (nativas e modificadas) foram analisadas no RVA. Para 4 g de cada amostra (umidade ajustada para 14% em base úmida) foram adicionados 25 g de água destilada. As suspensões assim preparadas foram colocadas, posteriormente, em recipientes de alumínio do equipamento, para a análise. O equipamento inicia a análise a 50°C por 2 minutos; aquece a uma razão de 14°C por minuto até atingir 95°C e permanece nesta temperatura por 5 minutos; resfria-se até 50 °C à mesma taxa de 14°C por minuto e mantêm-se esta temperatura (50°C) por mais 2 minutos, totalizando 13 minutos de análise. Durante toda a análise as suspensões foram agitadas empregando uma rotação de velocidade angular de 160 rpm. Foi utilizada a programação Std 1 (*Standard analysis 1*) do software *Thermocline for Windows*, versão 2.2 para coleta dos dados e análise dos resultados. Com os dados obtidos foram avaliadas as seguintes propriedades de viscosidade aparente em função da temperatura: temperatura de pasta (°C), viscosidade máxima (pico) (cP), viscosidade mínima (cP), quebra ou *breakdown* (diferença entre a viscosidade máxima e da pasta mantida a 95 °C por 5 minutos) (cP), viscosidade final (cP) e *setback* ou tendência à retrogradação (diferença entre as viscosidades final e da pasta a 50°C por 2 minutos) (cP). A temperatura de pasta é obtida, aproximadamente através do viscoamilograma, pelo ponto onde a viscosidade da suspensão começa a aumentar, na ocasião do aquecimento da pasta, a partir dos 50°C.

### 3.8.9 Determinação das propriedades térmicas e termodinâmicas

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi utilizada para detectar a transição térmica da gelatinização dos amidos de pinhão e milho nativos e modificados. Para isso, suspensões de amido em água destilada (2,5 mg amido/5,0 mg de água) foram pesadas e dispostas em pequenos suportes de alumínio. Os suportes foram imediatamente selados hermeticamente e equilibrados por 3 horas à temperatura ambiente antes de aquecimento no equipamento de DSC. O equipamento utilizado foi um calorímetro (TA-Instruments, USA, modelo 2010) e as amostras foram aquecidas de 30 a 120°C, à uma taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>. Um suporte vazio foi usado como referência. A entalpia de gelatinização ( $\Delta H_g$ , expressa em J.g<sup>-1</sup>) foi obtida através da integração da curva endotérmica obtida pelo equipamento, utilizando o software *Origin 6.0 Professional (Microcal)* baseado na massa de amido utilizada na análise, em base seca. A temperatura do pico endotérmico ( $T_p$ ) também foi obtida através do termograma, automaticamente. A temperatura inicial ( $T_i$ ) e de conclusão ou final ( $T_c$ ) foram determinadas através da endoterma. Todos os resultados foram obtidos através da média de três repetições.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO NATIVO

#### 4.1.1 Avaliação da semente do pinhão como fonte de amido

No procedimento de extração do amido de pinhão uma das etapas de maior cuidado foi a retirada da membrana interna do pinhão localizada entre a casca e a semente. Esta membrana deve ser retirada em sua totalidade pelo fato de transferir coloração de tonalidade marrom para o amido obtido, assim como de oferecer perigos de rancificação, devido ao seu elevado teor de lipídeos (Bello-Perez et al., 2006).

O índice de aproveitamento da semente de pinhão para a posterior obtenção do amido foi de 77%, similarmente ao que foi encontrado por Bello-Pérez et al. (2006) (78%) em seu estudo de caracterização do amido de pinhão.

O rendimento do pinhão em amido foi de  $42,97 \pm 1,46\%$  para o protocolo de extração com água,  $41,28 \pm 1,23\%$  para a extração com NaOH 0,05M e  $40,78 \pm 1,54\%$  para a extração com NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup>. Foi constatado que não houve diferença significativa (mediante Análise de variância (ANOVA) seguido de Teste de Tukey), entre os rendimentos do pinhão em amido para os diferentes protocolos de extração. Também se pode afirmar que, em comparação ao rendimento em amido das tuberosas batata inglesa (18%), mandioca (22-27%), araruta (8-16%), inhame (18-23%) e mandioquinha salsa (5-23%) (Franco et al., 2002), comumente utilizadas para a obtenção de amido, o resultado obtido indica o potencial industrial desta semente como fonte de amido (Franco et al., 2002). Entretanto, Bello-Pérez et al. (2006) em seu trabalho de extração de amido de pinhão obtiveram uma taxa de recuperação em torno de 70%, resultado bem maior ao encontrado neste trabalho. Esses autores utilizaram a passagem dupla do material liquidificado por uma peneira de nylon-100 com subsequente lavagem com água fria e secagem em estufa à 37°C, por 24 horas

#### 4.1.2 Análises Físico-químicas

Foram realizadas análises de umidade, proteína e lipídeos no amido de pinhão obtido através dos três métodos de extração (Tabela 10).

**Tabela 10:** Análises físico-químicas do amido de pinhão obtido através da extração com água e álcali ( $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  )

Análise (base seca)	Tratamento 1 (H <sub>2</sub> O)	Tratamento 2 (NaOH $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ )	Tratamento 3 (NaOH $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ )
Umidade (g/kg)	$31,57 \pm 0,19^a$	$35,06 \pm 0,40^b$	$12 \pm 0,17^c$
Proteína (g/kg)	$0,35 \pm 0,4^a$	$0,10 \pm 0,02^b$	$0,09 \pm 0,01^b$
Lipídeos (g/kg)	$0,47 \pm 0,07^a$	$0,31 \pm 0,00^b$	$0,16 \pm 0,01^c$

<sup>a,b,c</sup> Valores seguidos de letras distintas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Cladera-Olivera et al. (2008) em seus estudos de caracterização da semente de pinhão crua (sem casca) (safra 2006/comprado em Porto Alegre, RS), análise não realizada neste trabalho, apresentaram os seguintes resultados para análises físico-químicas: teor de proteínas (% bs) de  $2,97 \pm 0,05$  e teor de lipídeos (% bs)  $1,24 \pm 0,09$ , dentre outros resultados que serão discutidos posteriormente. Através desses resultados, comparativamente aos apresentados pela Tabela 10, pode-se concluir que o amido de pinhão nativo, após extração com água (método mais usual de extração) teve o teor de proteínas bastante reduzido, quando comparado ao pinhão cru (sem casca) (de 2,97 para 0,35%), o que demonstra que a maioria das proteínas ficou retida nas peneiras de extração, juntamente com o material fibroso. Este fato foi mais pronunciado na extração com álcali (NaOH), o que pode estar relacionado com o menor rendimento de extração obtido com estes tratamentos.

Também em relação ao teor protéico do amido de pinhão pode-se ressaltar que o mesmo possui baixos teores de proteínas quando comparado ao amido de milho nativo (0,43%) (Stahl et al., 2007), batata-baroa (1,64%) (Pereira et al., 1999) e mandioca (0,61-0,71%) (Ascheri, 1992) também extraídos com água. Este fato, de acordo com Bello-Perez et al. (2006) indica a não necessidade de uma etapa, durante o processo de extração, para a

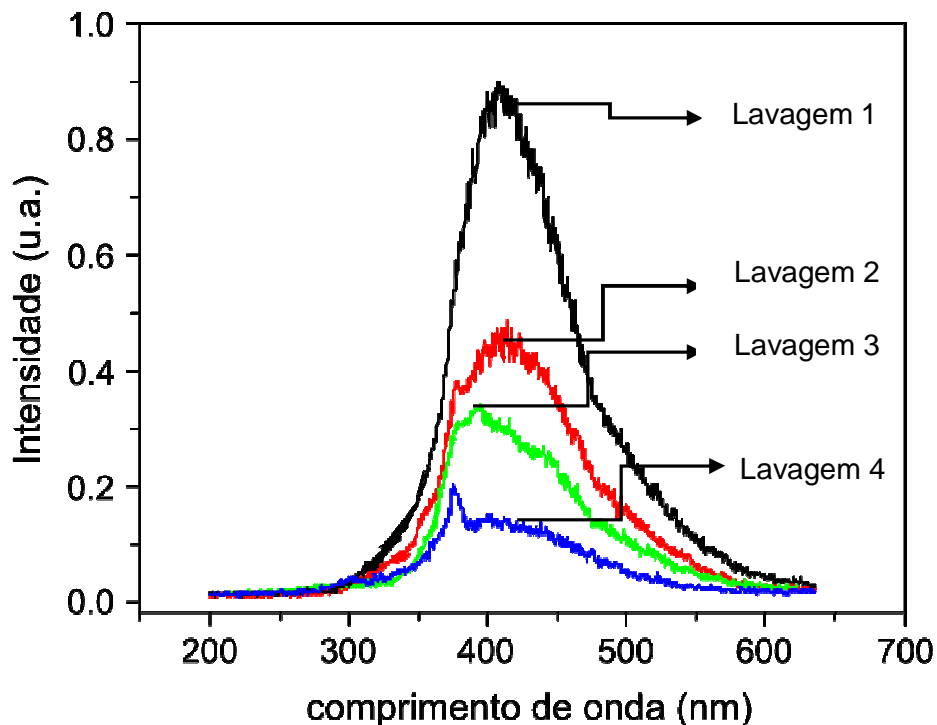
desproteínização do amido de pinhão, realizada por muitos pesquisadores através de tratamentos com álcali (Sodhi et al.,2003). Entretanto, de acordo com Cardoso et al., (2006) o crescente uso de amidos como aditivos na indústria de alimentos tem aumentado o interesse na separação dessas proteínas aderidas ao grânulo já que, quanto maior a pureza do grânulo, melhor o seu desempenho, como aditivo alimentar, pois menores são as interações geradas pela presença de proteínas ligadas à superfície do amido com os demais constituintes presentes. De maneira geral, pode-se dizer que conforme o uso, a etapa de desproteínização pode ser empregada, como por exemplo para a aplicação como veículo de medicamentos, onde uma grande pureza é requerida.

Com respeito aos lipídeos, Cladera-Olivera et al. (2008) reportaram valores de 1,24 %  $\pm$ 0,09 (% b.s.) para a semente de pinhão sem cascas. Este resultado, comparado aos valores encontrados para o teor de lipídeos no amido demonstraram que, a extração do amido de pinhão, assim como ocorreu no caso das proteínas, gerou uma drástica redução do teor de lipídeos, de 1,24% para 0,47% na extração com água, para 0,31% na extração com NaOH 0,05 mol.l<sup>-1</sup> e para 0,16 na extração com NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup>. Buléon et al. (1998) relatam que existem três tipos de componentes minoritários associados aos grânulos de amido, dentre os quais estão os materiais particulados, compostos principalmente por fragmentos de parede celular, os componentes internos e os componentes de superfície (lipídios, proteínas, enzimas, amino-ácidos e ácidos nucleicos). Estes últimos, segundo esses autores são os removíveis pelos procedimentos de extração do amido, o que foi comprovado pelos resultados descritos.

Para a utilização do amido na indústria de alimentos, a desproteínização do amido de pinhão torna-se irrelevante frente ao baixo teor de proteínas aderidas. Entretanto para o uso do amido de pinhão como veículo de medicamentos, esta etapa torna-se imprescindível.

### 4.1.3 Espectroscopia de fluorescência e determinação da proteína residual no amido extraído

A Figura 15 apresenta o espectro de fluorescência dos sobrenadantes obtidos durante a extração com água (para os outros tratamentos somente foi realizada a quantificação das áreas dos espectros, dados da Tabela 12). Na figura, cada curva representa o espectro de fluorescência do sobrenadante obtido após uma lavagem do amido extraído com água e posterior sedimentação. Ao total foram realizadas quatro lavagens com água, podendo-se então visualizar quatro espectros de fluorescência.



**Figura 15:** Espectro de fluorescência de proteínas presentes nos sobrenadantes obtidos após lavagem e centrifugação do material amiláceo.

A área das curvas apresentadas na Figura 15 representa o conteúdo de proteína extraída durante cada lavagem e a intensidade dos picos, a variabilidade das proteínas presentes (Cardoso et al., 2007). Agboola e Mills (2005) relatam que diferentes tipos de proteínas, quando aderidos à superfície do grânulo de amido, podem ser fracionados devido

à chamada solubilidade seletiva, isto é, um solvente pode ser solúvel para uma dada proteína não o sendo para outra, fazendo com que seja possível a sua separação.

A Tabela 11 apresenta as áreas das emissões de fluorescência calculadas para os diferentes sobrenadantes e tratamentos, assim como a quantidade de proteína residual no final de cada tratamento.

**Tabela 11:** Área dos picos dos espectros de fluorescência dos sobrenadantes para os diferentes solventes de extração e teor de proteína residual do amido extraído, após secagem em estufa.

Solvente de extração**	Área do Pico x 10 <sup>-3</sup> (Unidades Arbitrárias)*				Teor de proteína Residual ** (%)
	Lavagem 1	Lavagem 2	Lavagem 3	Lavagem 4	
Água	17,7	9,6	7,3	3,3	0,35 ± 0,04 <sup>a</sup>
NaOH 0,05 mol.l <sup>-1</sup>	11,6	14,7	9,9	3,4	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>
NaOH 0,1 mol.l <sup>-1</sup>	13,3	18,3	11,7	4,3	0,10 ± 0,02 <sup>b</sup>

\* Valores obtidos através de análise de multi-picos \*\* Proteína residual encontrada no amido de pinhão obtido após a quarta lavagem e posterior secagem em estufa por 72 horas, à 42°C. <sup>a,b</sup> Letras iguais na coluna indicam que não existem diferenças significativas obtidas a partir do teste de Tukey (p<0,05).

A redução das áreas dos picos em um mesmo tratamento é atribuída à redução da quantidade de proteína como consequência das lavagens seqüenciais. A área obtida após a primeira etapa de lavagem é normalmente relacionada à contribuição de todas as proteínas presentes na semente de pinhão, por este motivo possui, geralmente, o maior valor. Entretanto, pode-se evidenciar que para os tratamentos com álcali, as áreas da emissão de fluorescência obtidas para a primeira lavagem foram menores do que as obtidas para a segunda lavagem. Um efeito similar foi encontrado por Cardoso et al. (2007a) durante a extração alcalina de amido de arroz e segundo os autores esse fato foi atribuído ao “*quenching*” de fluorescência, que ocorre devido a alta concentração de proteínas em solução na primeira lavagem alcalina, o que dificulta a quantificação. Este fato não foi

observado durante a primeira etapa de lavagem do tratamento com água, provavelmente devido à reduzida quantidade de proteína extraída no mesmo.

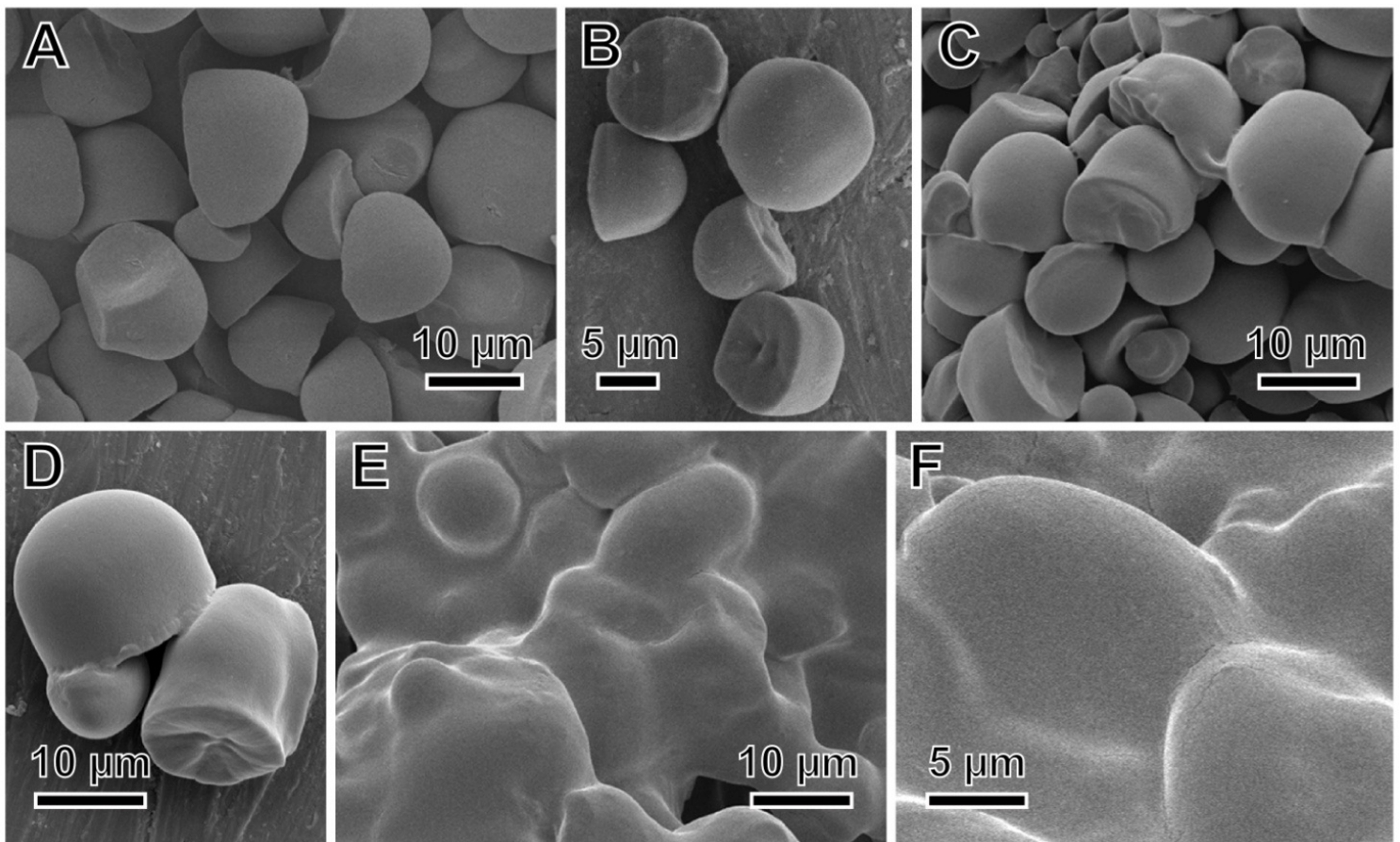
Devido ao fenômeno mencionado, a soma das áreas não pode ser utilizada para medir a quantidade de proteína extraída em cada tratamento. Como pode ser observada na Tabela 11, a quantidade de proteína residual foi de 0,35% para o tratamento com água e em torno de 0,10% para os demais (alcalinos), sendo essa redução significativa, comprovada pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Esse resultado pode ser explicado pelo efeito das soluções alcalinas na solubilização de glutelinas presentes na superfície do grânulo de amidos nativos extraídos de alguns cereais e tubérculos (Cardoso, 2007b). Neste caso, para o tratamento com água, as glutelinas permaneceram associadas aos grânulos de amido, o que gerou um maior valor na medida da proteína residual. Este fato é claramente associado ao fato das glutelinas serem extremamente solúveis em soluções alcalinas e praticamente insolúveis em água (Agboola e Mills, 2005).

Mesmo com indícios de que as referidas proteínas aderidas à molécula do amido de pinhão se tratam de glutelinas, pois assim como estas, são menos solúveis em água e mais solúveis em soluções alcalinas, esta hipótese ainda não pode ser confirmada, pois não existem na literatura trabalhos que especifiquem o tipo de proteína aderida à molécula do amido de pinhão, particularmente.

#### **4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Figura 16 mostra as fotomicrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura do amido de pinhão extraído através dos três tratamentos. As Figuras A, B e C estão com aumento de 2000x, as Figuras D, de 4000x, E de 2000x e F, de 6000x.





**Figura 16:** Imagens da MEV do amido de pinhão obtido após os diferentes tratamentos

(A e B, (extração em água); C e D, (extração em NaOH 0,05M); E e F, (extração em NaOH 0,1M).

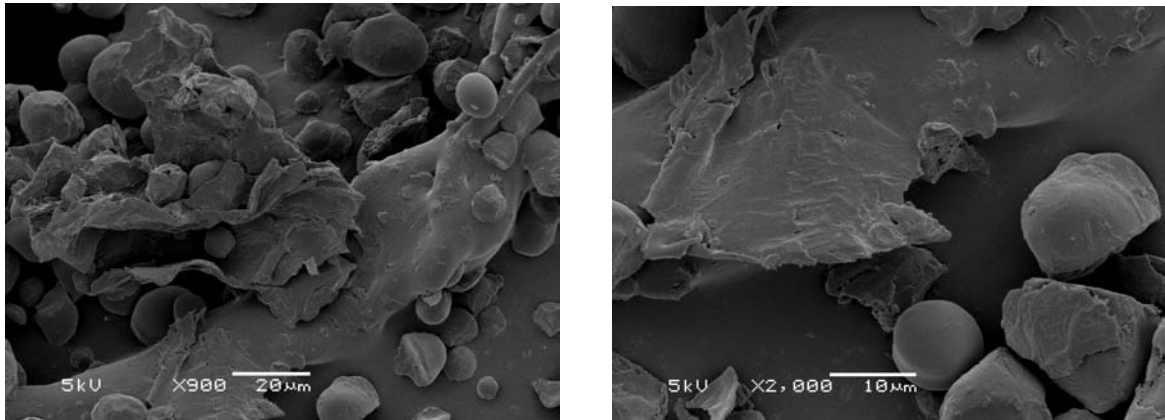
Com relação à morfologia do grânulo de amido de pinhão (16A), podem-se evidenciar as formas geométricas predominantes são as ovais e elipsóides truncados ou hemisféricos. O tamanho característico (diâmetro médio) se encontra na faixa de 7 e 20  $\mu\text{m}$ . Segundo Fennema (2000) o diâmetro médio do grânulo do amido de milho está em 15  $\mu\text{m}$ , da batata branca, em 33  $\mu\text{m}$ , da batata doce entre 25 e 50  $\mu\text{m}$ , da mandioca em 20  $\mu\text{m}$ , do trigo entre 20 e 22  $\mu\text{m}$  e do arroz em 5  $\mu\text{m}$ . Também se pode observar que a superfície dos grânulos é bastante lisa, sem apresentar irregularidades ou porosidade superficial (Figura 16B e 16D), também observados no amido de milho (Bello-Pérez et al., 2006). Essa característica do grânulo do amido de pinhão é importante, pois a presença de canais e porosidades,

presentes no amido de milho, segundo esses autores, pode ter efeito na reatividade do amido quando modificado quimicamente, assim como em suas propriedades funcionais e físico-químicas.

Para o tratamento com NaOH  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  (Figura 16C e 16D) pode-se observar que raramente aparecem os grânulos isolados e sim os grânulos agrupados, o que pode ser explicado pelo efeito do tratamento alcalino sobre os grânulos do amido, pois de acordo com Cardoso et al. (2007b) as soluções alcalinas alteram a estrutura dos grânulos. Este comportamento relaciona-se à formação de complexos NaOH-amido (Yovanovich,1951; Yovanovich e Champetier,1951) ou à gelatinização parcial dos grânulos (Cardoso et al., 2007b).

Para o tratamento com NaOH  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (Figura 16E e 16F) observa-se um filme contínuo devido à total perda da estrutura granular. Isto pode ser observado pelo aspecto de gel, apresentado pela amostra analisada. Um efeito similar foi observado por Cardoso et al. (2006) quando grânulos de amido de arroz foram tratados com NaOH (0,30% m/v). Em ambos os casos o efeito está relacionado ao tratamento alcalino, o qual gera a gelatinização do amido, em concentrações maiores do que 0,24% (m/v) (Cardoso et al.,2007b).

No caso da farinha de pinhão, através da MEV apresentada na Figura 17, se pode observar a existência de outros constituintes aderidos ao grânulo do amido, e entre os grânulos, cuja ausência é verificada na micrografia do amido após extração (Figura 16). Estes constituintes são basicamente fibras, que no processo de extração do amido foram parcialmente separadas no peneiramento (60 e 200 mesh), pois a concentração de fibras presente no amido foi de 0,4%. Cladera-Olivera et al., (2008) reportaram que o teor de fibras na farinha de pinhão é de 1,5%.

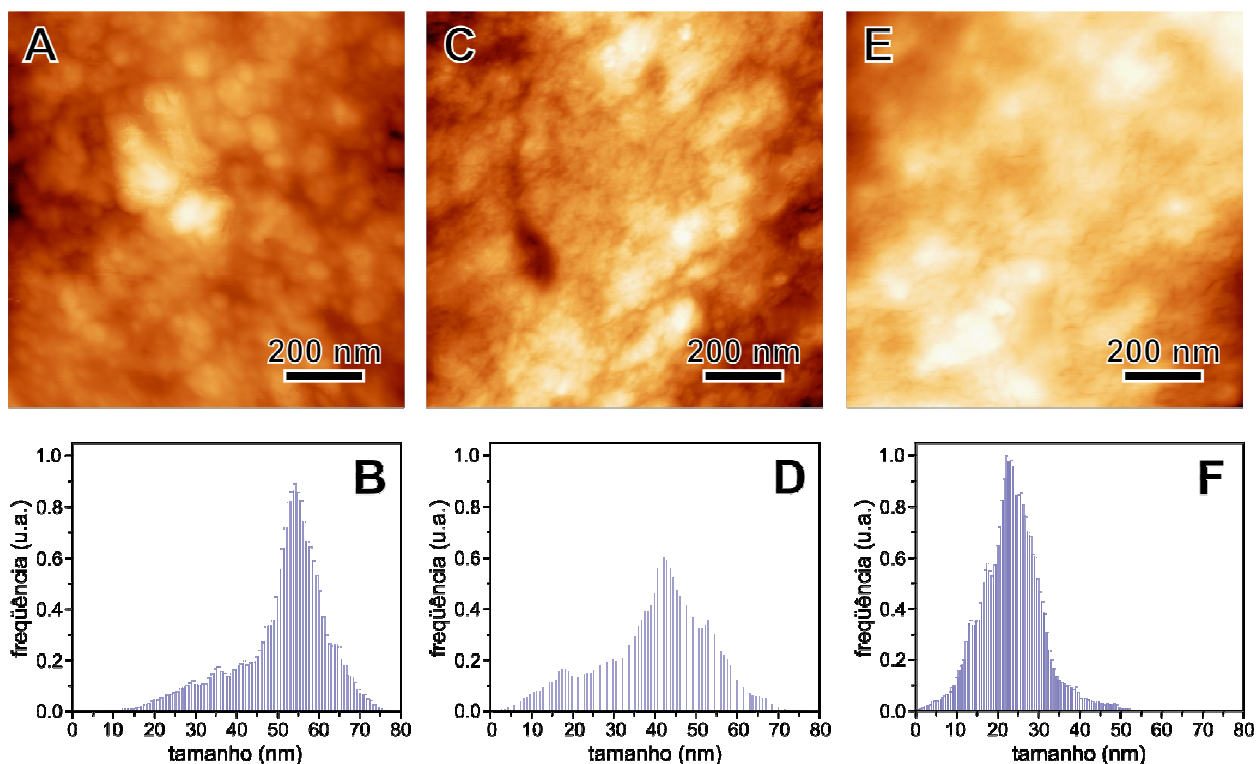


**Figura 17:** Imagens de MEV da farinha de pinhão (esquerda, aumento de 900x, direita, aumento de 2000x).

#### 4.1.5 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A Figura 18 mostra as imagens obtidas pela microscopia de força atômica, assim como a distribuição de alturas das protuberâncias da superfície dos grânulos de amido. A Figura 18A apresenta superfície do amido de pinhão extraído com água. Essas superfícies planas são compostas por protuberâncias regularmente espaçadas, referenciadas neste trabalho como nódulos. A distribuição de alturas dos nódulos da superfície do grânulo foi obtida através de quatro imagens diferentes (Figura 18B). Como pode ser observado, este histograma exibe uma distribuição monomodal entre 15 e 75 nm, apresentando um máximo em 55 nm. Baldwin et al. (1997) através de seu estudo com amido de batata detectaram nódulos maiores que 100 nm, o que não foi observado para os grânulos de amido de pinhão.

A Figura 18C apresenta as imagens de MFA obtidas para os grânulos de amido extraídos após o tratamento com NaOH ( $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ ) e a distribuição de altura dos nódulos da superfície deste amido é apresentada pela Figura 18D. Nesse caso, também se observa uma distribuição de alturas monomodal, entretanto na faixa entre 5 e 70 nm, com máximo em 42 nm, comparativamente menor do que a principal população encontrada para a extração com água. Este fato indica relevante alteração na superfície do grânulo provocada pelo procedimento de extração do amido com solução alcalina.



**Figura 18:** Imagens de MFA e dos histogramas de distribuição do tamanho de altura das superfícies dos grânulos do amido de pinhão obtido após os diferentes tratamentos.

A e B: extração com água; C e D: extração com NaOH 0,05 mol.l<sup>-1</sup> ; E e F: extração com NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup> .

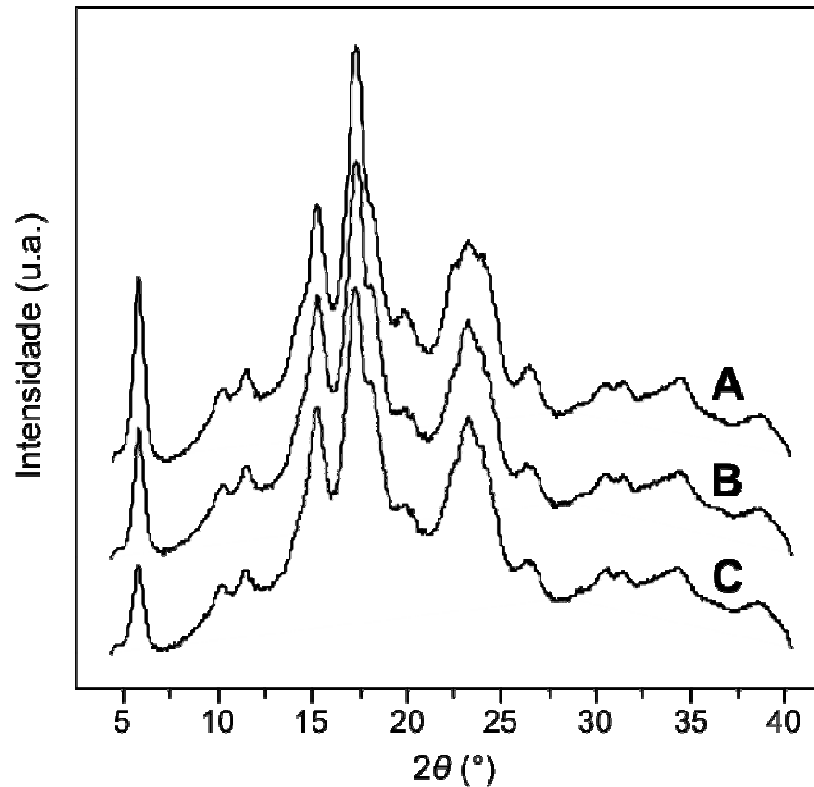
Para a extração com NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup> , os nódulos apresentaram uma significativa redução nas alturas (em nm), como pode ser observado pela Figura 18F.

Analisando os três tratamentos, pode-se afirmar que a população principal na distribuição das alturas dos nódulos foi claramente deslocada de valores altos (Figura 18B) para valores baixos (Figura 18F) quando a maior concentração do álcali foi empregada. Um efeito similar de redução de tamanho de nódulos foi descrito por Ayoub e Ohtani et al.(2006) para os grânulos de amido de arroz submetidos à liofilização e plasticização.

#### 4.1.6 Difractometria de raios X (DRX)

A Figura 19 mostra o difratograma de difração de raios-X do amido de pinhão. Como pode ser observado, as diferenças visualizadas nos perfis de DRX das amostras exibem diagramas do tipo C, o que sugere que o amido de pinhão seja composto de uma mistura de alomorfos dos tipos A e B. Esta constatação concorda com a literatura que diz que, com base na cristalinidade, o amido pode ser classificado em formas A, B, C, das quais a A e B encontram-se presentes nos cereais e a forma C, considerada uma mistura das anteriores, é encontrada na maioria dos tubérculos, leguminosas e sementes (Annison e Topping, 1994; Freitas, 2002), onde a semente de pinhão se inclui. Esta cristalinidade é, segundo os mesmos autores, atribuída à amilopectina formada pela associação das longas cadeias de polissacarídeos do grânulo de amido, por meio de pontes de hidrogênio.

Tipicamente os espectros do tipo A apresentam maiores picos de intensidade de refração para ângulos a  $2 \text{ \AA}$  a  $15, 17, 18$  e  $23^\circ$  sendo evidenciados em amidos de cereais. Já o tipo B apresenta maiores picos de intensidade de refração para os ângulos a  $2 \text{ \AA}$  a  $5.6, 15, 17, 22$  e  $23^\circ$  sendo mais comum nos amidos de tuberosas, frutas, assim como em amidos com alto conteúdo de amilose (Moore, 2001; Franco et al., 2002; Soares, 2003). O tipo C apresenta uma mistura das características A e B, com predominância de A (Mestres, 1996). Waliszewski et al. (2003) relataram um espectro de DRX do tipo C para o amido de banana (*Musa, var. valery*).



**Figura 19: Perfis de DRX dos grânulos de amido de pinhão**

(A, extração em água; B, extração com NaOH 0,05 mol.l<sup>-1</sup> ; e C, extração com NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup> )

O perfil apresentado pela Figura 19A corresponde ao do amido extraído com água. Para este caso, o índice de cristalinidade calculado foi de  $23,3 \pm 0,3\%$  e as frações dos alomorfos foram  $60 \pm 2\%$  para o espectro do tipo B e  $40 \pm 2\%$  para o espectro do tipo A, sendo a proporção entre os tipos A e B de 0,66. Na Figura 18B, após a extração com NaOH 0,05 mol.l<sup>-1</sup>, se observa que a intensidade dos picos característicos do tipo B foi reduzida drasticamente, mesmo assim, o perfil do tipo C dos grânulos do amido de pinhão manteve-se inalterado. O índice de cristalinidade, neste caso, foi reduzido para  $22,1 \pm 0,2\%$  como consequência do tratamento alcalino. O conteúdo de grânulos tipo B decresceu, enquanto o do tipo A manteve-se praticamente constante, o que acarretou em um crescimento no valor A/B para 0,85.

O efeito do tratamento alcalino é mais fortemente pronunciado no caso da extração com NaOH 0,1 mol.l<sup>-1</sup> (Figura 19C). O decréscimo da intensidade dos picos de difração do tipo B bem como a drástica redução da intensidade do pico a 5,6° indicaram a perda preferencial da estrutura do tipo B, comparativamente ao tipo A. O índice de cristalinidade foi de 19,1±0,4% e o valor A/B de 1,41. A queda no índice de cristalinidade das amostras em estudo, traduz a redução da força das ligações internas das moléculas, assim como do grau de associação entre as cadeias de amido (Salgado et al., 2005), o que é, segundo os resultados, potencializado com o tratamento alcalino e com o aumento da intensidade do mesmo.

Através do aumento do valor de A/B observado, pode-se afirmar que, como a solução alcalina age provavelmente de forma similar nas regiões internas e externas dos grânulos (devido à presença dos poros superficiais e canais interiores (Zhang e Hamaker et al., 2006), os cristalitos do tipo B, localizados no centro do grânulo tipo C, do amido de pinhão foram os mais afetados pela solução alcalina, já que foi evidenciado um decréscimo da fração amorfa do tipo B e a manutenção da fração amorfa do tipo A.

## **4.2 CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO NATIVO**

Todas as análises que seguem foram feitas no amido de pinhão extraído com água.

### **4.2.1 Análises Físico químicas**

Os resultados das análises físico-químicas de umidade, amido, amilose, fibras e cinzas estão apresentados pela Tabela 12.

**Tabela 12:** Dados obtidos para as análises físico-químicas do amido de pinhão nativo

<b>Análise</b>	<b>Composição (%)<sup>1</sup></b>
Umidade	12,21±1,24%
Amido (b.s.)	69,13 ± 0,22%
Amilose (b.s.)	26,3 ± 0,70%
Cinzas (b.s.)	0,44 ± 0,00%
Fibra bruta (b.s.)	0,39 ± 0,00%

<sup>1</sup> Média de três determinações (b.s.).

Os resultados apresentados para o teor de amido após a extração (69,13%) foram menores do que os encontrados por Bello-Pérez (2006) em seu estudo com amido de pinhão, que foi de 86%. Este fato pode ser explicado pela diferença de protocolos utilizados, assim como pelas diferenças da matéria prima utilizada, que foram colhidas em diferentes regiões, São Paulo e Rio Grande do Sul, por Bello-Pérez (2006) e o presente trabalho, respectivamente.

O teor de amilose encontrado para o amido de pinhão foi de 26,3 ± 0,7%, similar ao encontrado por Bello-Pérez et al. (2006) de 25%±0,6%, e Stahl et al. (2007) de 23,54%±1,74%. O baixo teor de amilose encontrado para o amido de pinhão, segundo Bello-Pérez et al. (2006) é o responsável por um importante papel nas propriedades físico-químicas e funcionais do amido de pinhão, já que, segundo os mesmos autores, a amilose é a principal responsável pelo fenômeno de retrogradação do amido.

Vários autores reportaram os teores de amilose de diferentes espécies botânicas, muitas vezes não evidenciando valores similares, o que é devido a diferenças nas espécies, locais de cultivo das mesmas, assim como nas épocas de colheita (Moorthy, 2004; Hoover, 2001; Salgado et al., 2005; Sandhu et al., 2007). Algumas diferenças encontradas foram, para amido de batata, 8,5 e 38 % de amilose (Moorthy, 2004), para amido de mandioca, 13,6 e 27% (Hoover, 2001), para amido de milho, entre 16,8 e 21,3% (Sandhu et al., 2007) e para amido de cenoura, 15,1 e 38% (Hoover, 2005).



O teor de cinzas (%bs) foi de 0,40%, superior ao declarado por Bello-Pérez (2006) de 0,04%, e próximo ao encontrado por Stahl et al. (2007), de  $0,32\% \pm 0,09\%$ , em seus estudos com amido de pinhão.

O teor de fibras encontrado do amido extraído de 0,39% foi menor ao relatado por Stahl et al. (2007) de  $0,86 \pm 0,40\%$ . Segundo esses autores, as diferenças encontradas estão relacionadas às diferenças nos protocolos de extração utilizados e/ou na matéria prima.

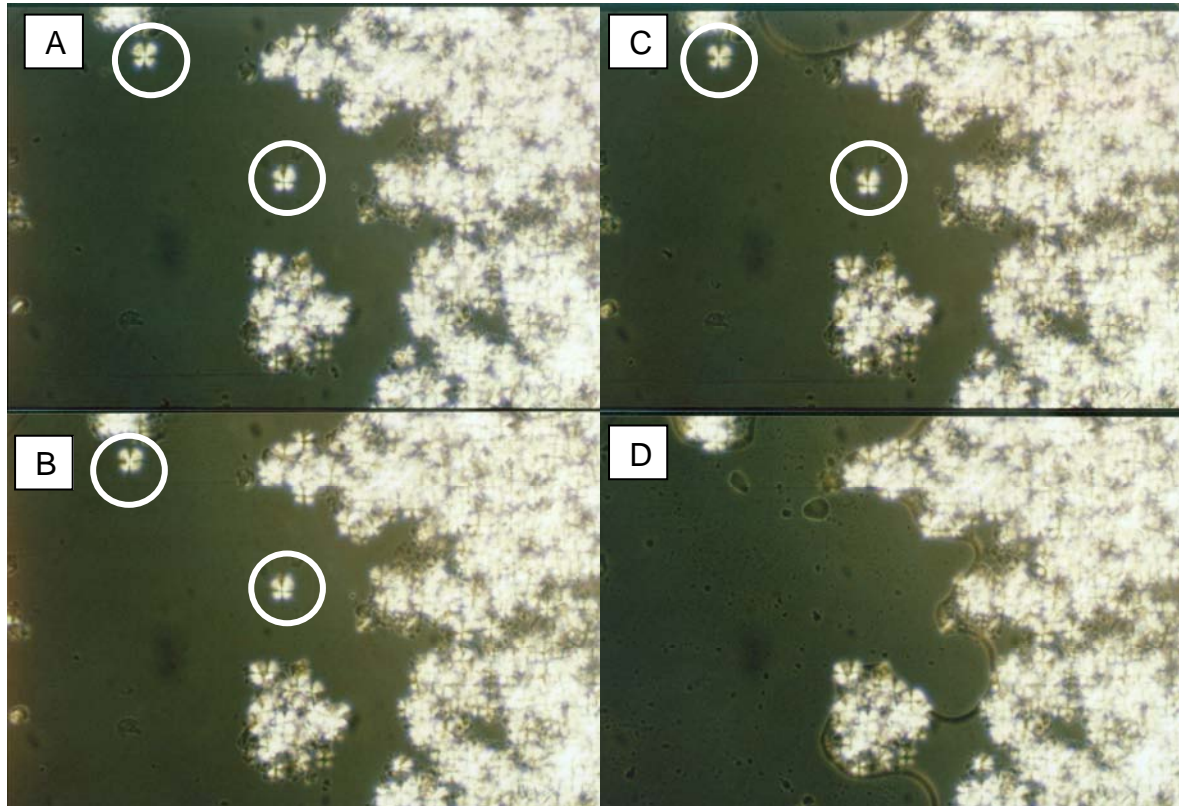
#### **4.2.2 Microscopia ótica**

A Figura 20 apresenta as fotomicrografias sob a luz polarizada do amido de pinhão obtidas através da microscopia ótica, sob uma rampa de aquecimento de 30 a 80°C. As fotomicrografias obtidas nas temperaturas de 40°C e 45,3°C, respectivamente mostram que, os grânulos de amido possuem sua estrutura intacta, mantendo o comportamento birrefringente e a “Cruz de Malta” bem definida, característica de amidos nativos. A birrefringência refere-se a um alto grau de orientação molecular e nada sugere em relação a formas cristalinas particulares (Bello-Perez et al., 2006). A presença da birrefringência e consequentemente da Cruz de Malta, para ambos os casos, indica que não foram perdidas as características do grânulo de amido não gelatinizado (Whistler e Paschall, 1965).

Na microscopia obtida a 47,1°C ainda se percebe a presença da birrefringência, indicando a presença de uma estrutura organizada. No entanto, à temperatura de 50,3°C pode-se verificar que os grânulos isolados desapareceram isto é, perderam a sua birrefringência ou a “Cruz de Malta”. Este fato indicaria que a temperatura inicial de gelatinização do amido de pinhão seria próxima a esta temperatura, isto porque os grânulos, devido à heterogeneidade dos seus cristais, não gelatinizam à mesma temperatura. Os maiores geralmente gelatinizam primeiro, portanto a temperatura de gelatinização representa uma soma de eventos particulares e a gelatinização ocorre em uma faixa de temperatura (Marcon et al., 2007). Somente através de análises como a calorimetria diferencial de varredura (DSC) pode-se determinar a temperatura inicial de gelatinização do amido de pinhão com maior precisão.

Fenemma (2000) relata faixas de temperatura de gelatinização de diferentes espécies de amido, milho (61-72°C), batata branca (62-78°C), mandioca (59-70°C), trigo (53-64°C) e

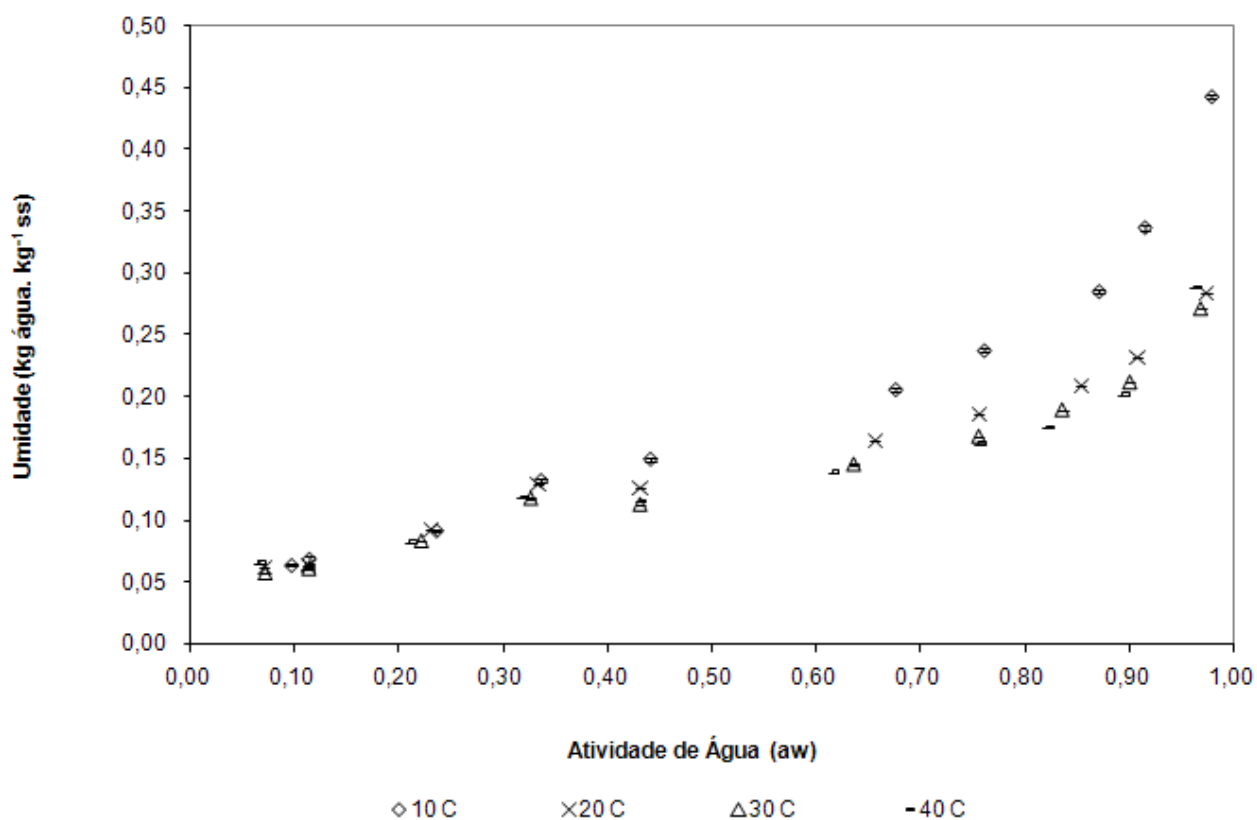
arroz (65-73°C), onde se pode perceber uma diferença de  $\pm 10^\circ\text{C}$ , entre a temperatura inicial e final de gelatinização.



**Figura 20:** Micrografia em luz polarizada (200X) do amido de pinhão nativo, sob diferentes temperaturas (A:40°C; B: 45,3°C; C: 47,1°C; D: 50,3°C)

### 4.2.3 Isotermas de sorção do amido de pinhão nativo

A Figura 21 mostra as curvas experimentais obtidas relacionando a umidade de equilíbrio, em base seca, do amido de pinhão com a sua atividade de água para as temperaturas estudadas (10, 20, 30 e 40°C). Os valores experimentais representam a média de duas réplicas.



**Figura 21:** Valores experimentais de umidade de equilíbrio (base seca) em função da atividade de água ( $a_w$ ) para amido de pinhão em diferentes temperaturas e modelo de GAB

A figura mostra que a umidade de equilíbrio diminui com o decréscimo da atividade de água ( $a_w$ ) para uma determinada temperatura. Este comportamento é manifestado na forma de uma curva sigmóide que corresponde a uma isoterma do Tipo 2, de acordo com a classificação de Brunauer (Mathlouthi e Rogé, 2003), que torna-se assintótica a partir de valores de atividade de água ao redor de 0,40. Este resultado concorda com o encontrado

por Al-Muhtaseb et al. (2004b) na qual um comportamento de isotermas de adsorção do tipo 2 foi encontrado para amido de batata, de altos conteúdos de amilopectina e amilose. Também, Van den Berg (1975) e McMinn (2003) mencionam esse mesmo comportamento ao estudar as isotermas de amidos de batata e trigo.

Os dados apresentados na Figura 21 também mostram que o conteúdo de umidade decresce com o aumento da temperatura, a um mesmo valor de atividade de água, o que indica que o amido de pinhão torna-se menos higroscópico com o aumento da temperatura.

Existem, segundo a literatura, diversas discussões a respeito: segundo Mazza e LeMaguer (1980) este fato pode ser devido à redução do número de sítios (grupos hidroxila) disponíveis, das regiões amorfas ou da superfície das regiões cristalinas, para ligações com a molécula de água (pontes de hidrogênio), como resultado de mudanças químicas e/ou físicas no produto geradas pela temperatura. Por outro lado, Palipane e Discroll (1992) sugerem que sob altas temperaturas, as moléculas de água são ativadas a níveis mais altos de energia, fazendo com que as mesmas se tornem menos estáveis, assim levando ao rompimento das ligações estabelecidas com os sítios de sorção do alimento e, portanto ocasionando a redução da umidade.

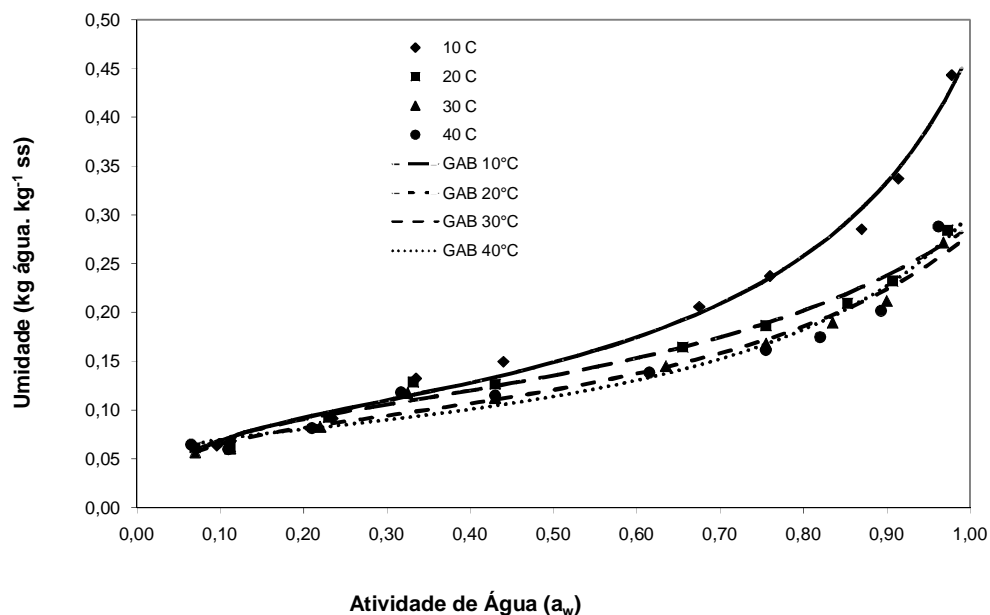
Também pode-se verificar que as isotermas apresentadas são dependentes da temperatura, para valores de  $a_w$  maiores que 0,6, o que indica que a influência da temperatura (entre 10 e 40°C) é relevante nas isotermas de adsorção do amido de pinhão, resultado este similar ao encontrado por Al-Muhtaseb et al. (2004b) para as isotermas do amido de batata. Segundo Mok e Dick (1991), alimentos ricos em amido e proteína têm os dados de sorção afetados pela temperatura, devido à grande quantidade de sítios polares presentes, tais como -OH e  $-H^+$ , que são centros ativos de sorção.

No entanto, para o pinhão cru descascado, assim como para o pinhão cozido, Cladera-Olivera et al. (2008a) reportaram que a temperatura tem pouco efeito nas isotermas de dessorção. Os mesmos autores reportaram que para a farinha de pinhão, o mesmo ocorre para as isotermas de adsorção.

Os parâmetros para os modelos de adsorção do amido são mostrados na Tabela 13, em conjunto com o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) e o erro relativo médio (ERM). O modelo de Peleg foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais na faixa de temperaturas

estudadas, seguido do modelo de Chung-Pfost e GAB. O modelo de Peleg apresentou valores de ERM entre 3,88% e 6,27% (valor médio 4,80%). Já o modelo de Chung-Pfost apresentou valores entre 2,86% e 7,21% (valor médio 5,11%) e o modelo de Gab entre 5,05 e 8,5% (valor médio de 6,17%).

Esses resultados foram similares aos encontrados por Al-Muhtaseb et al. (2004b) e Delgado e Sun (2002) para as isotermas de amido de batata, assim como para Peng et al. (2007), para amido de milho. Já Van der Berg (1975), Mc Minn e Magee (1996) e Timmermann et al. (2001) reportaram que o modelo de GAB representou muito bem as isotermas de batata, amido de trigo, dentre outros materiais amiláceos. Neste trabalho, baseado no fato de que os três modelos acima discriminados apresentaram valores de ERM menores que 10% para todas as temperaturas, preferiu-se trabalhar com o modelo de GAB, por ser este um modelo semi-teórico e amplamente utilizado em materiais alimentícios (Gabas et al., 2007). A Figura 22 apresenta o modelo de GAB ajustado aos dados experimentais.



**Figura 22:** Modelo de GAB ajustado aos dados experimentais de umidade de equilíbrio (base seca) em função da atividade de água ( $a_w$ ) para amido de pinhão em diferentes temperaturas

O conteúdo de umidade de monocamada ( $X_m$ ), que é um parâmetro importante para prever as condições de armazenamento e a deterioração de alimentos, obtido pelos modelos de BET e GAB é um indicador da disponibilidade dos sítios polares para estabelecer ligações com as moléculas de água (Chung e Pfof, 1976). Pode-se perceber que o valor de  $X_m$  no modelo de GAB diminui com o aumento da temperatura. Similar comportamento teve o valor de  $X_m$  apresentado pelo modelo de BET, modelo válido somente para  $a_w$  entre 0,2 e 0,6 (Labuza, 1975).

Este decréscimo no teor de umidade da monocamada pode ser explicado pelas mudanças estruturais no amido devido ao aumento da temperatura, onde o grau das

ligações de hidrogênio é reduzido com o aumento da temperatura, diminuindo a disponibilidade dos sítios ativos para possíveis ligações com a molécula de água e, portanto, diminuindo a umidade da monocamada (Westgate et al., 1992).

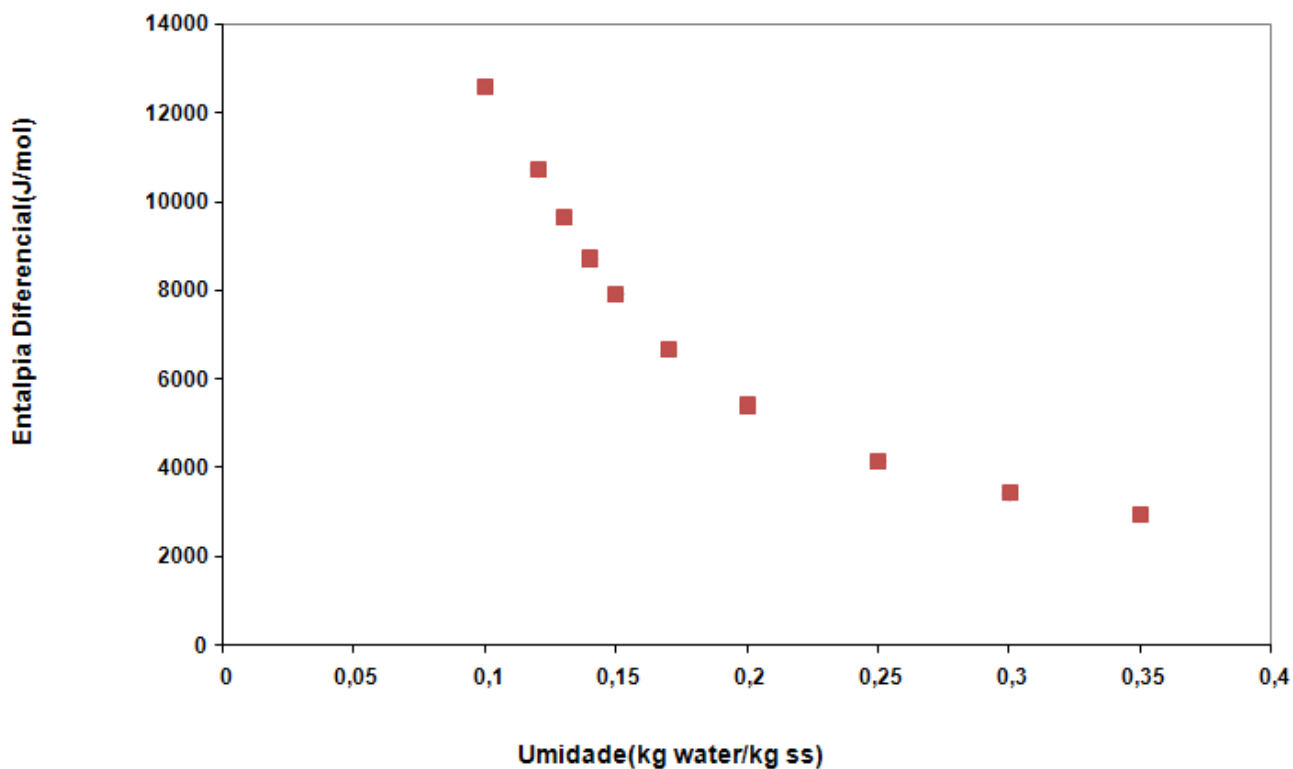
**Tabela 13:** Valores dos parâmetros preditos e erro relativo médio (ERM) obtidos para os diferentes modelos de adsorção aplicados aos dados experimentais para o amido de pinhão

Modelo	Constante	Temperatura				Média
		10 ° C	20 ° C	30 ° C	40 ° C	
BET	X <sub>m</sub>	0,09	0,08	0,07	0,07	
	C	14,37	25,58	31,12	47,36	
	r <sup>2</sup>	0,97	0,91	0,88	0,84	
	<b>ERM (%)</b>	<b>4,08</b>	<b>7,79</b>	<b>7,11</b>	<b>9,97</b>	<b>7,24</b>
GAB	X <sub>m</sub>	0,10	0,10	0,08	0,07	
	C	22,61	28,25	37,87	113,09	
	K	0,80	0,67	0,71	0,76	
	r <sup>2</sup>	0,99	0,98	0,98	0,95	
	<b>ERM (%)</b>	<b>5,84</b>	<b>5,29</b>	<b>5,04</b>	<b>8,5</b>	<b>6,17</b>
Helsey	A	0,02	0,00	0,00	0,00	
	B	1,86	2,79	2,57	2,69	
	r <sup>2</sup>	0,97	0,96	0,96	0,95	
	<b>ERM (%)</b>	<b>20,84</b>	<b>28,93</b>	<b>27</b>	<b>26,9</b>	<b>25,92</b>
Peleg	k <sub>1</sub>	0,26	0,11	0,13	0,17	
	k <sub>2</sub>	0,65	10,12	9,85	0,43	
	n <sub>1</sub>	0,24	0,20	0,18	0,21	
	n <sub>2</sub>	10,91	0,49	0,47	14,76	
	r <sup>2</sup>	0,9979	0,9937	0,993	0,9897	
	<b>ERM (%)</b>	<b>3,88</b>	<b>4,53</b>	<b>4,53</b>	<b>6,27</b>	<b>4,80</b>
Oswin	A	0,16	0,13	0,12	0,12	
	B	0,28	0,22	0,24	0,26	
	r <sup>2</sup>	1,00	0,97	0,98	0,99	
	<b>ERM (%)</b>	<b>11,82</b>	<b>10,53</b>	<b>7,78</b>	<b>5,89</b>	<b>9,01</b>
Chung-Pfost	A	12,18	20,15	20,64	20,11	
	B	4,97	10,40	8,98	8,52	
	r <sup>2</sup>	1,00	0,98	0,99	0,97	
	<b>ERM (%)</b>	<b>2,86</b>	<b>6,5</b>	<b>3,87</b>	<b>7,21</b>	<b>5,11</b>
Henderson	A	-16,66	-82,63	-79,49	-70,76	
	B	1,75	2,45	2,32	2,26	
	r <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,98	0,94	
	<b>ERM (%)</b>	<b>5,85</b>	<b>4,48</b>	<b>5,3</b>	<b>9,67</b>	<b>6,33</b>
Chirife	A	-2,03	-2,06	-2,22	-2,27	
	B	-0,60	-0,58	-0,49	-0,36	
	C	0,11	0,23	0,13	0,02	
	r <sup>2</sup>	0,99	0,98	0,98	0,98	
	<b>ERM (%)</b>	<b>8,11</b>	<b>6,63</b>	<b>6,73</b>	<b>8,52</b>	<b>7,50</b>
Smith	A	0,08	0,08	0,07	0,07	
	B	-0,23	-0,14	-0,14	-0,15	
	r <sup>2</sup>	0,98	0,94	0,96	0,97	
	<b>ERM (%)</b>	<b>10,53</b>	<b>14,61</b>	<b>11,59</b>	<b>9,15</b>	<b>11,47</b>



Na Tabela 13 verifica-se que o valor de  $K$  no modelo de GAB ficou em torno de 0,7, para as temperaturas estudadas, o que concorda com Labuza (1975) que indica esse valor para alimentos que contenham amido. Essa constante é um parâmetro de correção das propriedades das moléculas da multicamada em relação ao líquido *bulk* (Hebrard et al., 2003). O valor da constante  $C$  para o modelo de GAB foi maior que 2,0. Segundo Blahovec (2004) quando  $0 < K < 1$  e  $C > 2$  a isoterma é do tipo II, o que confirma a observação realizada anteriormente.

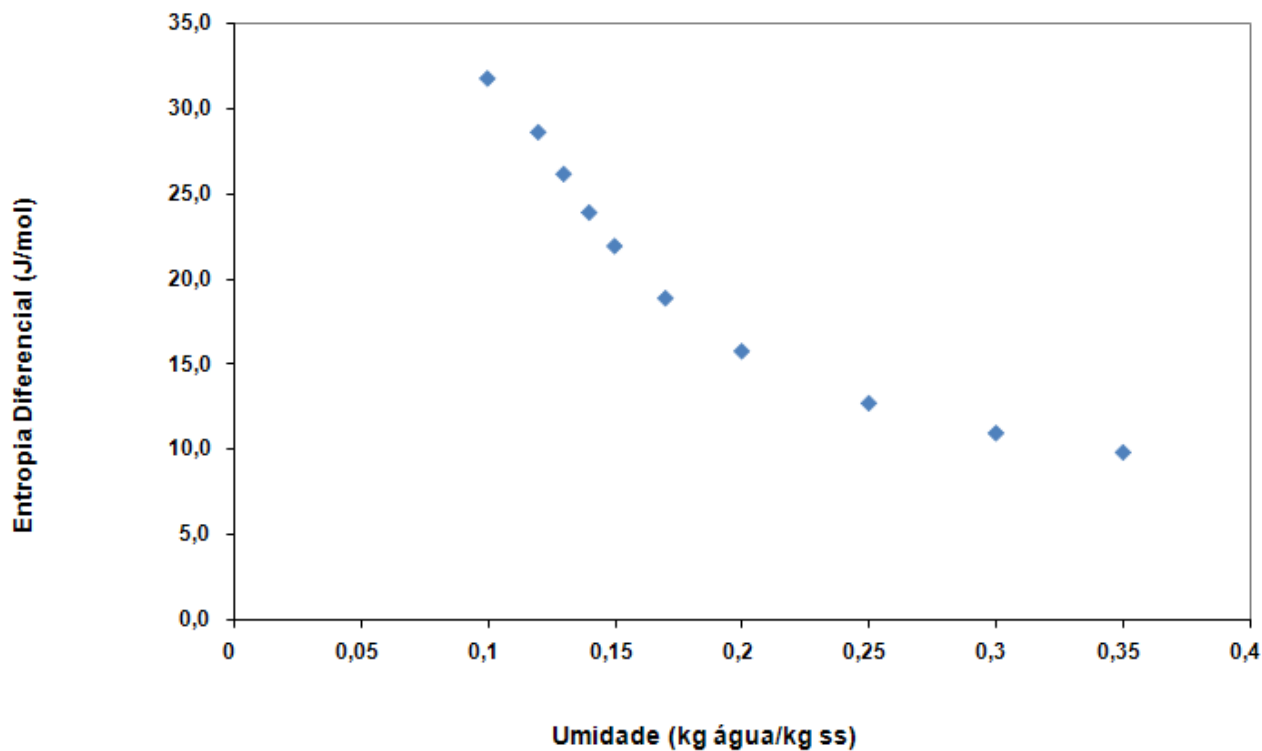
A Figura 23 mostra os valores de entalpia diferencial de adsorção do amido ( $\Delta h$ ) em função da umidade de equilíbrio. Na figura pode-se observar que a energia requerida para a sorção aumenta quando diminui a umidade de equilíbrio. O calor de sorção começa a aumentar drasticamente a baixos conteúdos de umidade (umidades menores que  $0,25 \text{ kg kg}^{-1}$  bs) e decresce rapidamente com o aumento do conteúdo de umidade, até a curva tornar-se assintótica. Segundo Shivhare et al. (2004), os altos valores do calor de sorção (entalpia diferencial) em baixos teores de umidade indicam a forte interação entre o alimento e a água contida nele, no produto desidratado. Ao aumentar o conteúdo de umidade, os sítios disponíveis para a sorção diminuem, resultando em valores de entalpia diferencial menores (Shivhare et al., 2004).



**Figura 23:** Entalpia diferencial de adsorção do amido de pinhão em função do conteúdo de umidade de equilíbrio

Al-Muhtaseb et al. (2004a) apresentaram valores muito menores para a entalpia diferencial de adsorção do amido de batata, sob mesmos valores de umidade. Este fato demonstra que o amido de pinhão possui mais sítios polares na sua superfície do que o amido de batata por eles estudado (fornecedor Roquette, UK) e, portanto, a energia necessária para estabelecer a ligação entre a molécula de água e a superfície do grânulo, para o amido de pinhão é maior do que para o amido de batata. Van den Berg et al. (1975) que em seu estudo abordando a capacidade de ligação com água do amido de batata, estabeleceram que o mesmo possui a mais alta capacidade de ligação com água de todas as espécies de amido nativas já estudadas, devido ao fato deste possuir os menores graus de associação entre as suas moléculas, o que discorda com o apontado neste trabalho.

Os valores de entropia diferencial de adsorção ( $\Delta S$ ) em função da umidade são mostrados na Figura 24.

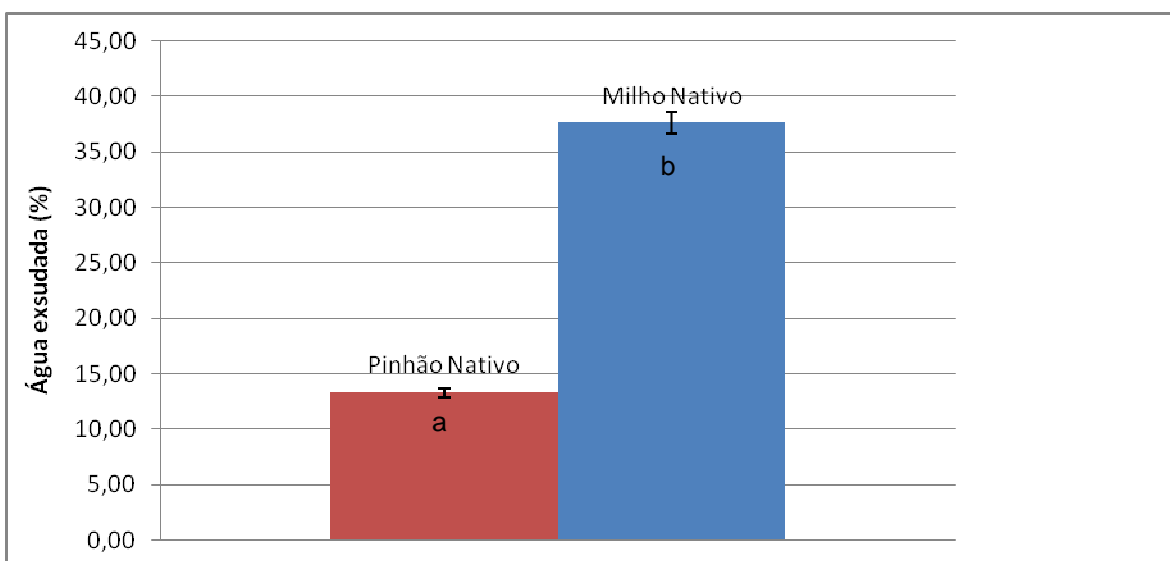


**Figura 24:** Entropia diferencial de adsorção do amido de pinhão em função da umidade de equilíbrio

Para a estimativa de  $\Delta S$  (assim como no caso do  $\Delta h$ ) considerou-se que estas propriedades não variam com a temperatura, à umidade constante (Aguerre et al., 1986). Pode-se observar que a entropia diferencial depende fortemente da umidade, para valores de umidade menores do que  $0,25 \text{ kg água kg}^{-1} \text{ ss}$ , o que segundo a literatura indica que o número de sítios de sorção disponíveis para estabelecer ligações com as moléculas de água aumentam à medida que a umidade diminui, o que para o amido de pinhão começa a ocorrer para valores de umidade inferiores  $0,25 \text{ kg água kg}^{-1} \text{ ss}$ . Resultado similar foi encontrado por Al-Muhtaseb et al. (2004a) para amido de batata, assim como para variedades com alto conteúdo de amilose e alto conteúdo de amilopectina.

#### 4.2.4 Sinerese do amido nativo de pinhão

A sinerese apresentada pelo amido de pinhão nativo, após refrigeração (5°C) aos 28 dias, esta apresentada pela Figura 25. Para fins de comparação, foi conjuntamente analisado o amido de milho nativo.



**Figura 25:** Sinerese das pastas de amido de milho e pinhão nativos durante armazenagem a 5°C durante 28 dias

A porcentagem de água exsudada pelo amido de pinhão foi de 14%. Stahl et al. (2007) encontraram que a porcentagem de sinerese do amido de pinhão nativo, após 28 dias, à mesma temperatura, foi de aproximadamente 17%.

A sinerese do amido de pinhão foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que a do amido de milho após refrigeração (5°C) por 28 dias. Esse resultado indica que o amido de pinhão é menos propenso à retrogradação do que o amido de milho. Este comportamento pode ser explicado pelo menor conteúdo de amilose do amido de pinhão (26,3%) em relação ao de milho (aproximadamente 30%) (Stahl et al, 2007), o que traduz-se em uma menor probabilidade de retrogradação, já que este fenômeno, segundo Ishiguro et al. (2000), ocorre preferencialmente na amilose e nas cadeias mais longas da amilopectina. Em complementação, Jane (1995) afirma que a taxa de retrogradação depende das cadeias

longas de amilose, que, com cerca de 100 unidades de glicose, têm grande tendência a retrogradar.

Através da menor sinerese apresentada pelo amido de pinhão frente ao amido de milho pode-se indicar o maior potencial de aplicação do amido de pinhão em produtos perecíveis que possuem necessidade de armazenamento sob refrigeração.

#### 4.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA POR HIDRÓLISE ÁCIDA DO AMIDO NATIVO DE PINHÃO

##### 4.3.1 Estudo preliminar do tempo de reação de hidrólise

A Tabela 14 apresenta os resultados do estudo do tempo de reação de hidrólise para temperatura de 37°C e uma concentração de ácido clorídrico de 2,2 mol.l<sup>-1</sup>, cujas respostas são dadas em teores de dextrose equivalente, uma medida do conteúdo de açúcares redutores expresso como glucose, que equivale ao índice do grau de hidrólise do amido. Os resultados para cada tempo estudado representam a média de três repetições.

**Tabela 14:** Resultados do estudo da variável tempo na reação de hidrólise

Teste	Parâmetros			Respostas
	T (°C)	HCl (mol.l <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	DE (mg glicose/ml)*
1	37	2,2	3	0,26 ± 0,06 <sup>a</sup>
2			6	2,68 ± 0,07 <sup>b</sup>
3			9	5,89 ± 0,05 <sup>c</sup>

\* Média de três repetições ± desvio padrão. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05). Ensaio realizado a 37°C com 2,2 mol.l<sup>-1</sup> de HCl.

Na Tabela 14 se observa que para um tempo de reação de 3 horas o valor de DE foi considerado baixo (0,26) o que pode acarretar na não ocorrência da hidrólise, sob condições mais amenas de temperatura e concentração de ácido. O tempo de hidrólise de seis horas inicialmente estipulado para a condução da hidrólise ácida gera uma resposta mensurável, isto é DE > 0. Além disto, uma reação de hidrólise de apenas seis horas torna-se bastante

interessante sob o ponto de vista industrial, por questões econômicas já que, tradicionalmente, os resultados alcançados nas reações tradicionais de hidrólise ácida parciais são alcançados em tempos maiores (Mun e Shin, 2006).

Para o tempo de reação de 9 horas, o valor de DE ficou próximo de 6,0, significativamente maior do que os demais tratamentos, entretanto, neste caso, as propriedades de substituto de gordura, isto é, a formação de gel termorreversível, segundo Zambrano e Camargo (1998) não são mais garantidas, ainda mais sob as condições mais severas de temperatura e concentração de ácido que serão estudadas no presente trabalho.

#### **4.3.1.1 Planejamento experimental para avaliação da reação de hidrólise**

A Tabela 15 apresenta os resultados de dextrose equivalente (DE) e porcentagem de hidrólise provenientes do planejamento experimental empregado, para um tempo de 6 horas de reação. A porcentagem de hidrólise é um valor diretamente proporcional ao valor de dextrose equivalente (calculado através do valor de DE, equação 4.9), sendo mais passível de comparações com a bibliografia já que muitos autores a reportam diretamente em seus trabalhos (Mun e Shin, 2006; Jakyakody e Hoover, 2002; Lim et al., 2004, dentre outros).

As temperaturas empregadas foram menores do que 50°C, pois conforme os resultados obtidos pela microscopia ótica o início da temperatura de gelatinização do amido de pinhão encontra-se próximo a 50,3°C.

**Tabela 15:** Valor de dextrose equivalente e porcentagem de hidrólise dos hidrolisados mediante diferentes condições de hidrólise ácida do amido de pinhão

Tratamento	Valores Codificados		Valores Reais		Dextrose Equivalente (mg glicose/ml) <sup>1</sup>	Porcentagem de hidrólise (%)
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Concentração HCl (mol.l <sup>-1</sup> )		
1	-1	-1	30	1,2	0,00 ± 0,000	0,00
2	+1	-1	44	1,2	1,75 ± 0,063	0,63
3	-1	+1	30	3,2	0,00 ± 0,042	0,00
4	+1	+1	44	3,2	6,5 ± 0,026	2,34
5	0	0	37	2,2	2,8 ± 0,073	1,00
6	0	0	37	2,2	2,7 ± 0,074	0,97
7	0	0	37	2,2	2,7 ± 0,074	0,97

1 Média de três determinações ± desvio padrão.

Na Tabela 16 são apresentados os coeficientes de regressão do modelo, os quais foram significativos ( $p < 0,05$ ) para os fatores temperatura, concentração de ácido clorídrico assim como para a interação entre estes.

**Tabela 16:** Coeficientes estimados da análise de regressão para as variáveis codificadas

Fator	Coeficiente	Erro Padrão	Valor de t	Valor de p
Interseção	2,29	0,03	79,39	0,008
x <sub>1</sub>	4,13	0,04	58,34	0,01
x <sub>2</sub>	2,38	0,04	33,59	0,02
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	2,38	0,04	33,59	0,02

A equação resultante para o modelo empírico codificado é apresentada abaixo.

$$DE = 2,29 - 4,13.x_1 - 2,38.x_2 - 2,38.x_1x_2$$

(4.13)

Onde:

- $x_1$ , a temperatura (valor codificado);
- $x_2$ , a concentração de ácido clorídrico (valor codificado).

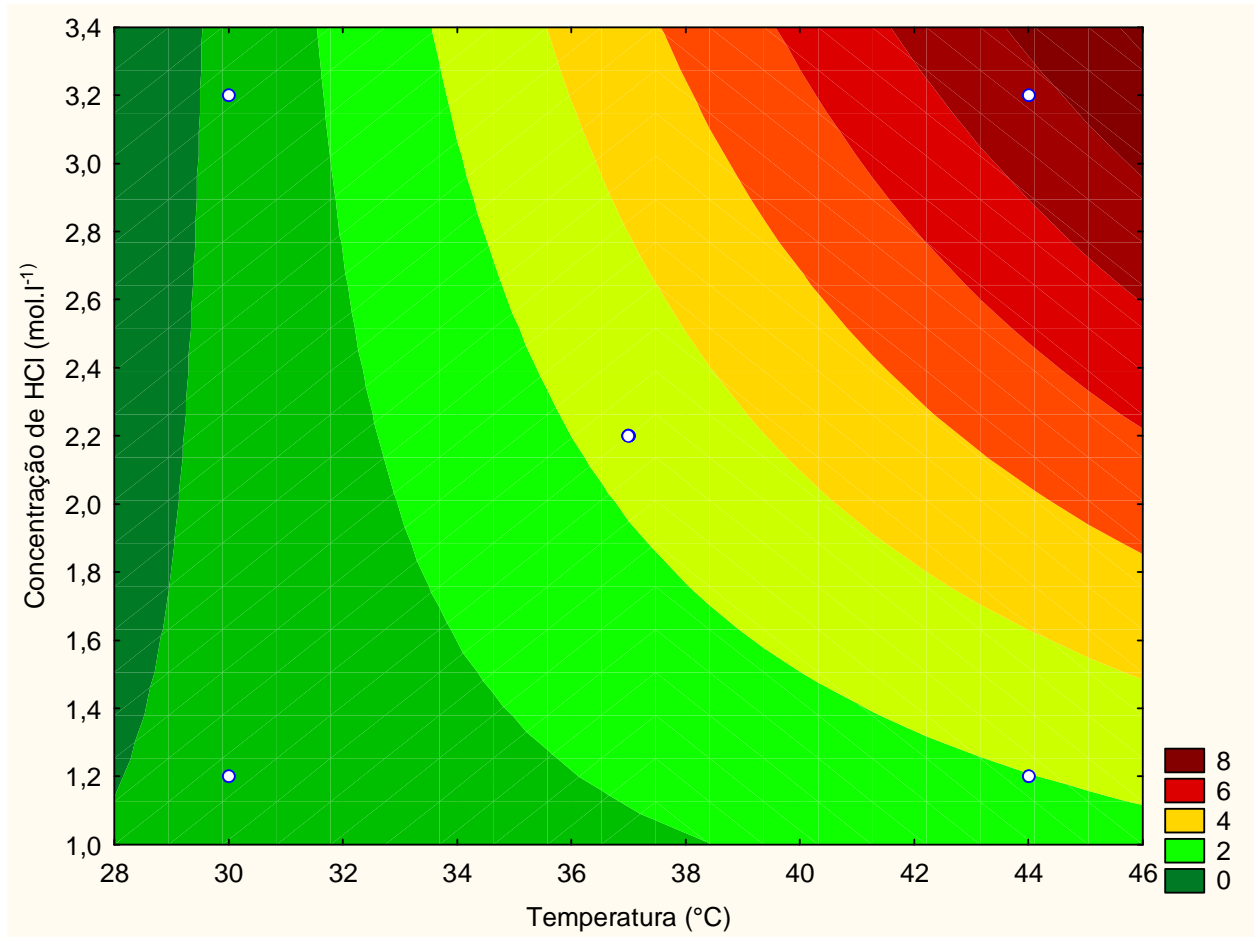
A análise de variância (ANOVA) para o modelo de superfície de resposta de primeira ordem se apresenta na Tabela 17, onde se observa que a análise de regressão mostrou um bom ajuste ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ), cujo  $r^2 = 0,9280$ .

**Tabela 17:** Análise de variância (ANOVA) para o índice de dextrose equivalente dos hidrolisados

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Soma do Quadrado Médio</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>
Regressão	28,297	3	9,432	29,70	19,16
Resíduo	0,635	2	0,318		
Erro Puro	0,005	1	0,005	0,01	161,4
Falta de Ajuste	0,630	1	0,630		
Total	28,932	5			

O gráfico das linhas de contorno apresentado pela Figura 26 demonstra que os maiores valores de dextrose equivalente são alcançados para as maiores temperaturas e maiores concentrações de ácido clorídrico empregados, o que concorda com a literatura que indica que a hidrólise ácida se potencializa em maiores valores de temperatura da reação e concentração de ácido utilizadas, para um mesmo tempo de hidrólise (Lim et al., 2004; Jayakody e Hoover, 2002; Mun e Shin, 2006).





**Figura 26:** Valores de Dextrose Equivalente observado como uma resposta da interação entre as variáveis temperatura e concentração de ácido clorídrico, após hidrólise ácida.

A Tabela 18 relaciona os valores de dextrose equivalente obtidos, com a porcentagem de hidrólise e os testes de formação e termorreversão do gel.

**Tabela 18:** Relação entre o valor de dextrose equivalente e a porcentagem de hidrólise com a formação e termorreversão do gel para o amido hidrolisado de pinhão

Tratamento	Parâmetros da reação		Dextrose Equivalente (mg glicose/ml) <sup>1</sup>	Porcentagem de hidrólise (%)	Formação de gel	Termorreversão do gel
	Temperatura (°C)	Concentração HCl (mol.l <sup>-1</sup> )				
1	30	1,2	0,00±0,000	0,00	Sim	Não
2	44	1,2	1,75±0,063	0,63	Sim	Não
3	30	3,2	0,00±0,042	0,00	Sim	Não
4	44	3,2	6,5± 0,026	2,34	Sim	Sim
5	37	2,2	2,8±0,073	1,00	Sim	Sim
6	37	2,2	2,7±0,074	0,97	Sim	Sim
7	37	2,2	2,7±0,074	0,97	Sim	Sim

Nos tratamentos cujos valores de DE foram maiores do que 2,5, com porcentagem de hidrólise maiores do que 0,95% foram observadas a formação de gel termorreversível, conseqüentemente isto indica uma aplicabilidade potencial do amido hidrolisado como substituto de gordura, já que a gordura igualmente à um gel termorreversível, possui a capacidade de fundir-se e termorreverter, quando exposta à temperaturas altas e baixas, respectivamente. Resultados similares também foram reportados por National Starch and Chemical Corporation (1985), indicando que hidrolisados com DE entre 5,0 e 8,0 formam géis termorreversíveis.

Nos tratamentos cujas porcentagens de hidrólise foram menores ou iguais a 0,63 %, o gel não termorreverteu. Zambrano e Camargo (2001a) no estudo de hidrólise ácida de amido de mandioca relataram que alguns dos tratamentos estudados tiveram valores de DE entre 1,0 e 2,0 e geraram géis não termorreversíveis.

Mun e Shin (2006) obtiveram porcentagem de hidrólise menores do que 5% para o amido de milho nativo hidrolisado parcialmente por ácido, (10 g de amido em 40 ml de solução ácida a 0,1 mol.l<sup>-1</sup>/35°C), porém com 30 dias de reação.

Lim et al. (2004) encontraram para a hidrólise do amido nativo de milho (1 mol.l<sup>-1</sup> de concentração de HCl), uma porcentagem de hidrólise de 47,4%, após o 20° dia de reação. Jayakody e Hoover (2002) encontraram uma porcentagem de 73,4% para a mesma espécie

de amido sob condições de  $2,2 \text{ mol.l}^{-1}$  (HCl) e  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  , após o 15° dia de reação. O fato da maior ou menor susceptibilidade do grânulo de amido ao ácido (taxa e grau de hidrólise alcançados), sob determinada condição, está relacionado a diferenças no tamanho do grânulo, tipo de cristalinidade e composição do amido, como o conteúdo de amilose e o grau de fosforilação do mesmo (Gerard et al.,2002; Hoover, 2000; Jacobs et al., 1998; Jane et al., 1997; Li et al., 2001). A porção da fração amorfa do amido (Mun e Shin, 2007) influencia fortemente o ataque ácido, já que este reage preferencialmente com esta região do grânulo (Komiya e Nara, 1986; Komiya, Yamada e Nara, 1987). Devido a este fato tem-se que, em amidos modificados por ácidos, o conteúdo de amilose decresce após a modificação, já que segundo Atichokudomchai et al.,(2000), este polímero reside preferencialmente na região amorfa do grânulo.

Com respeito aos tratamentos 1 e 3 foram obtidos valores de DE iguais a zero. Este fato indica que à  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a mudança de concentração de  $1,2 \text{ mol.l}^{-1}$  para  $3,2 \text{ mol.l}^{-1}$  não influencia na hidrólise do amido.

A hidrólise quando induzida para mudar características funcionais (emprego como substituto de gordura, agente ligante) deve alcançar um grau de hidrólise (que se relaciona tanto com o valor de DE, quanto com o valor da porcentagem de hidrólise alcançada) não excessivo (DE maiores do que 10), já que segundo Zambrano e Camargo (1999), quando a hidrólise ácida se estende em demasia, quer por condições excessivas de tempo, temperatura ou concentração de ácido, a propriedade de formação de gel se perde e assim, o amido não tem mais aplicação como substituto de gordura. Essas mesmas autoras também afirmam que para aplicação como agente ligante, este valor não poderia ser demasiadamente baixo (DE menores que 2,5).

Assim, as características de formação de gel e termorreversibilidade do gel do amido modificado foram utilizadas como critério para a seleção das condições de hidrólise do amido de pinhão para uso como substituto de gordura. A escolha destes parâmetros foi baseada em estudos anteriores (Furcsik et al., 1992; Lenchin et al., 1985; Zambrano e Camargo, 1998) que mostraram a importância da formação de géis termorreversíveis, para uso como substituto de gordura.

A análise dos resultados considerando esses parâmetros, mostrou que os tratamentos 4, 5, 6 e 7 produziram géis termorreversíveis, portanto qualquer um destes tratamentos poderia ser selecionado se o intuito fosse somente a obtenção de um substituto de gordura.

Entretanto, a fim de dar maior potencial de aplicabilidade ao amido modificado, optou-se pelo tratamento 4 ( $3,2 \text{ mol.l}^{-1}$  e  $44 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para que a utilização como agente ligante pudesse ser viabilizada, já que o valor de DE alcançado (6,5) não é muito baixo ( $\sim 2,5$ ).

Correlacionando os resultados aqui apresentados com aos descritos pela Tabela 14 pode-se perceber que resultado similar (5,89) para dextrose equivalente foi obtido para a hidrólise ácida nas condições de  $37^\circ\text{C}$  e  $2,2 \text{ mol.l}^{-1}$  de ácido clorídrico, entretanto para um tempo de 9 horas de reação. Este fato indica que o tratamento ácido prolongado, em condições mais amenas, também seria satisfatório para o propósito em questão, levantando, portanto a necessidade de avaliação do custo operacional para a melhor avaliação das condições do processo.

#### **4.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS NATIVOS E MODIFICADOS**

Os resultados apresentados a seguir têm por objetivo avaliar as propriedades do amido de pinhão adquiridas após a modificação via hidrólise ácida em comparação ao amido de pinhão nativo, amido de milho nativo e amido de milho hidrolisado.

A modificação do amido de milho e pinhão foi realizada empregando temperatura de 44 °C e 3,2 mol.l<sup>-1</sup> de concentração de HCl, com um tempo de 6 horas.

##### **4.4.1 Porcentagem de Recuperação do Amido após a Hidrólise Ácida**

A porcentagem de recuperação do amido de pinhão após hidrólise ácida foi de 42,97% ± 1,46 e para o amido de milho de 63,3% ± 0,29, sendo, portanto, a recuperação do amido de pinhão 20% menor em relação ao amido de milho.

Shujun et al. (2007) relataram uma porcentagem de recuperação para o amido ácido modificado de Rizoma de *Dioscorea* de 60%, em seis dias de hidrólise, com temperatura de 35°C e 2,2 mol.l<sup>-1</sup> de HCl, que reduziu com o aumento do tempo de reação.

Estes resultados indicam que a técnica de modificação utilizada neste trabalho ainda pode ser melhorada, assim como, as faixas de estudo para temperatura e concentração de ácido clorídrico (item acima) revistas, de forma a aumentar a recuperação do amido durante o processo de modificação ácida.

##### **4.4.2 Formação, Fusão e Termorreversibilidade do Gel**

Os resultados para a formação, temperatura de fusão e termorreversibilidade do gel para os amidos nativos e modificados de pinhão e milho, estão apresentados pela Tabela 19. A termorreversibilidade somente foi realizada nos géis que fundiram, nas condições da análise.

**Tabela 19:** Formação, fusão e termorreversibilidade do gel dos amidos nativos e modificados de amido de pinhão e milho

<b>Amido</b>	<b>Formação de Gel</b>	<b>Fusão de Gel</b>	<b>Termorreversibilidade do Gel</b>
Pinhão Nativo	Sim	Não	-
Milho Nativo	Sim	Não	-
Pinhão Modificado	Sim	Fusão a 46°C	Termorreverteu sem sinerese
Milho Modificado	Sim	Fusão a 23°C	Termorreverteu com sinerese

A formação de gel pelos amidos modificados comprova que o grau de hidrólise sofrido pelas moléculas do amido em ambas as espécies, não foi muito extenso, conservando-se neles uma das propriedades requeridas para os amidos utilizados como substitutos de gordura, que é a formação de gel (Radley, 1976). A modificação ácida teve um forte efeito nas propriedades de ambas as espécies de amido analisadas, já que os amidos nativos formaram géis que não fundiram, após aquecimento.

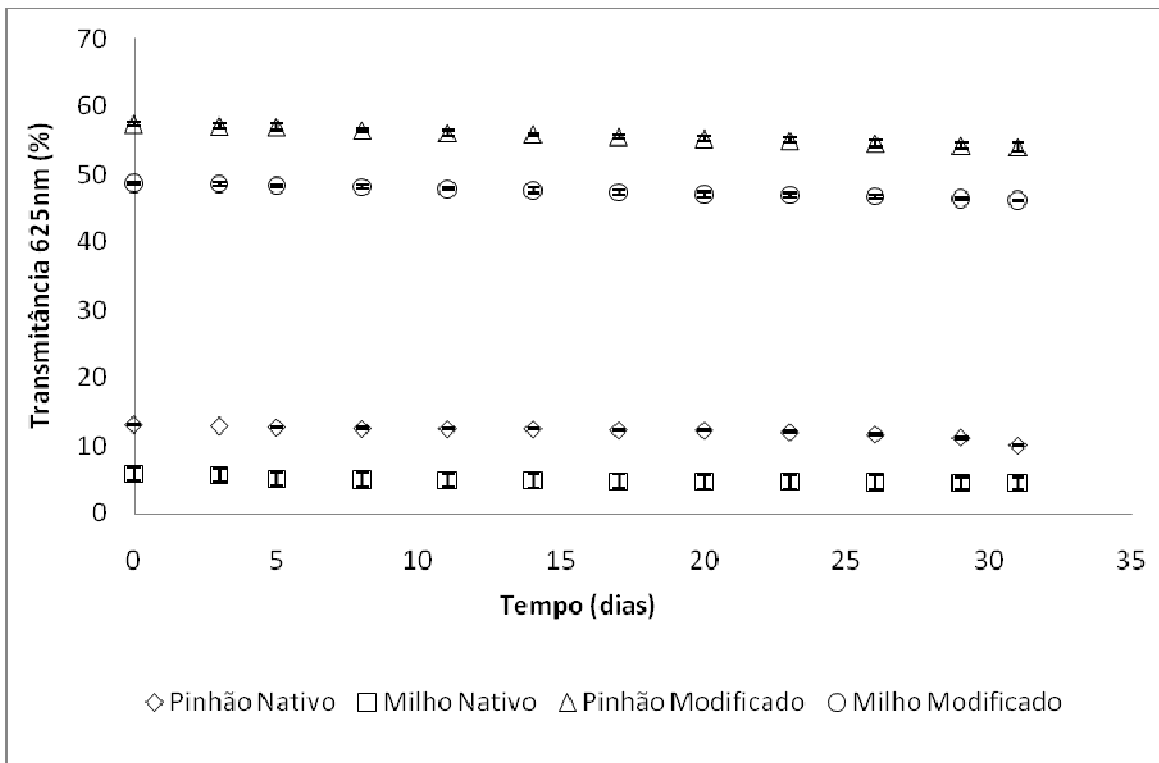
O amido de milho modificado fundiu a 23°C e o de pinhão à 46°C. Ambos apresentaram termorreversão dos seus géis quando submetidos à refrigeração, após fusão. Esse valor de ponto de fusão em conjunto com a propriedade de termorreversão, garantem a aplicabilidade do amido de pinhão como substituto de gordura na formulação de bolos, pois segundo Blanshard et al.(1987), o ponto de fusão das gorduras para este fim depende da composição de ácidos graxos e geralmente varia na faixa de 37 – 45°C.

#### **4.4.3 Determinação da tendência à retrogradação dos amidos nativos e modificados**

A verificação da tendência à retrogradação dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho foi realizada através da observação da influência do tempo de armazenamento na opacidade das pastas dos amidos, apresentada pela Figura 27. Os amidos nativos e modificados mostram a tendência à diminuição da transmitância das pastas, com o aumento do tempo de armazenamento. Segundo Stahl et al. (2007) a retrogradação é a responsável pela tendência da pasta de amido em tornar-se opaca (redução de %T) e formar géis com estruturas rígidas durante o resfriamento, o que significa que com o decorrer do tempo de armazenamento o polissacarídeo tende a retrogradar.

Quando comparado o amido de pinhão com o amido de milho, pode-se verificar que, tanto para a espécie nativa quanto para a modificada, o amido de pinhão mostrou menor opacidade, isto é, maior % de transmitância. Este fato, segundo o mesmo autor, sugere que o amido de pinhão é menos susceptível à retrogradação do que o amido de milho e está de acordo com o menor conteúdo de amilose presente no amido de pinhão (23,6%), quando comparado ao milho (~30%) (Bello-Pérez et al., 2006). Este fato concorda com o resultado obtido pela análise de sinerese, apresentada no item 5.2.4.

Durante a estocagem, pode-se verificar que a transmitância dos amidos modificados foi maior do que a apresentada para os amidos nativos. Este resultado concorda com o obtido por Sandhu et al. (2007) onde foi verificado um efetivo aumento na porcentagem de transmitância de luz nos amidos de milho ácido modificados, quando comparado ao amido de milho nativo. Segundo Lawal (2004), esse aumento na transmitância da luz, após a reação de hidrólise ácida do amido, deve-se à redução da tendência à retrogradação. A remoção da região amorfa durante a hidrólise ácida aumenta a formação de pontes interativas entre as moléculas da amilopectina e, portanto aumenta a sua transmitância.

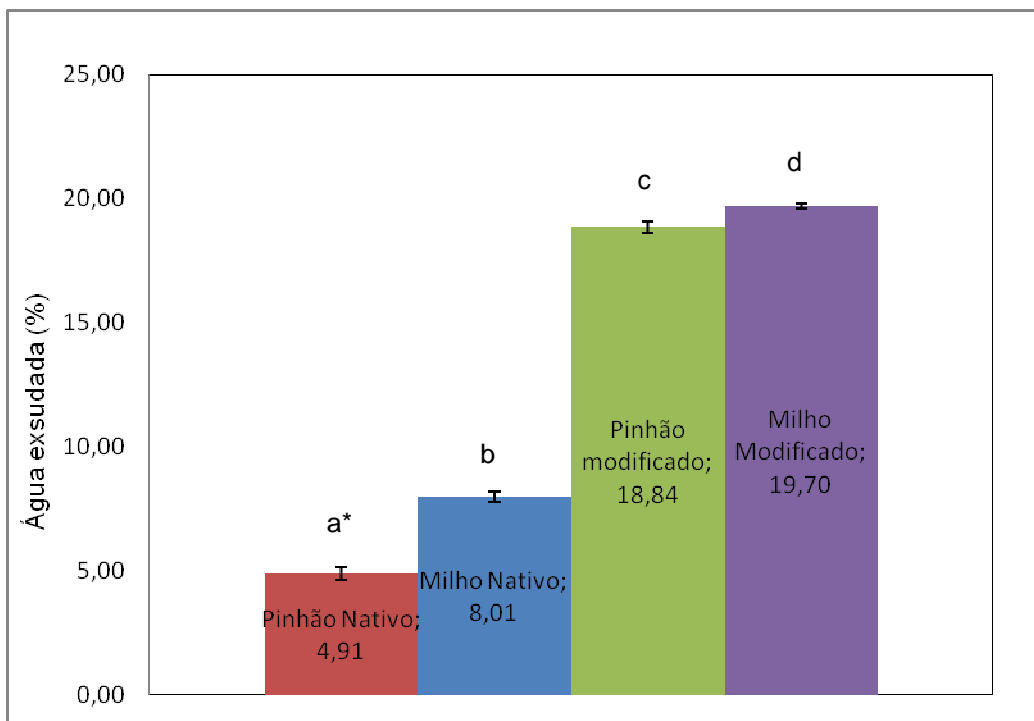


**Figura 27:** Opacidade da pasta dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho (transmitância à 625nm).

#### 4.4.4 Estabilidade ao Congelamento e Descongelo

A Figura 28 mostra a estabilidade dos amidos de pinhão e milho nativos e modificados, após seis ciclos de congelamento e descongelamento. Nela se observa que os amidos nativos (pinhão e milho) foram susceptíveis à liberação de água após o congelamento e descongelamento, demonstrando suas baixas resistências ao processo aplicado. Takizawa et al. (2004) verificaram que para a mesma análise, os amidos nativos de mandioca e milho ceroso mostraram-se resistentes ao congelamento e descongelamento, enquanto que os amidos de mandioquinha salsa, batata, batata doce e milho regular mostraram susceptibilidade ao processo, apresentando liberação de água de suas pastas (sinerese), similarmente ao ocorrido neste trabalho.





**Figura 28:** Sinerese das pastas de amido de milho e pinhão seis ciclos de congelamento e descongelamento

(\*Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ )).

Comparando as espécies pinhão e milho, verifica-se que os amidos de pinhão nativo e modificado apresentaram maior estabilidade aos ciclos de congelamento e descongelamento, resultado interessante para a sua possível utilização em alimentos sujeitos à conservação sob congelamento, já que o gel formado liberou, significativamente, menos água. Esses resultados foram melhores aos encontrados por Stahl et al. (2007), para os amidos nativos de pinhão e milho (submetidos a três ciclos de congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) e descongelamento ( $30^{\circ}\text{C}$ )), onde a exsudação de água para o amido de pinhão foi de aproximadamente 77% e, para o amido de milho, de aproximadamente 82%, resultado que apresentou diferença similar ( $\sim 5\%$ ) à aqui encontrada, entre as espécies em questão.

Esse resultado indica que o amido de pinhão possui maior aplicabilidade frente ao de milho como ingrediente em alimentos sujeitos à conservação sob congelamento, pois possui menor tendência à sinerese (Marcon et al., 2007).

Também se observa que os amidos modificados apresentaram maior sinerese, similarmente ao encontrado por Takizawa et al. (2004) e Shirai et al. (2007), que atribuíram a maior liberação de água à ocorrência de uma degradação parcial das macromoléculas constituintes do amido, o que ocorre no caso da reação de hidrólise ácida. Esse fato evidencia que o processo de modificação ácida não gera uma maior estabilização das pastas de amido expostas a ciclos de congelamento e descongelamento.

#### 4.4.5 Poder de Inchamento (PI) e índice de Solubilização (IS) para os amidos nativos

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos para o poder de inchamento dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho.

**Tabela 20:** Poder de Inchamento dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho em função da temperatura

Temperatura	Poder de Inchamento (g H <sub>2</sub> O/g amido base seca)			
	Pinhão Nativo	Milho Nativo	Pinhão modificado	Milho Modificado
25°C	1,76 <sup>aA</sup> ± 0,13	1,93 <sup>bA</sup> ± 0,01	2,16 <sup>cA</sup> ± 0,01	2,34 <sup>dA</sup> ± 0,00
50°C	1,91 <sup>aB</sup> ± 0,01	1,92 <sup>aA</sup> ± 0,00	2,25 <sup>bB</sup> ± 0,02	2,27 <sup>bB</sup> ± 0,02
60°C	3,84 <sup>aC</sup> ± 0,02	4,18 <sup>bB</sup> ± 0,01	2,07 <sup>cC</sup> ± 0,03	2,18 <sup>dC</sup> ± 0,01
70°C	11,08 <sup>aD</sup> ± 0,04	4,82 <sup>bB</sup> ± 0,02	1,55 <sup>cD</sup> ± 0,00	1,66 <sup>dD</sup> ± 0,00

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão ( $n = 3$ ). Médias seguidas de letras minúscula diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas através do teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O resultado apresentado pela Tabela 20 indica a forte influência da temperatura no poder de inchamento (capacidade de retenção de água) para o amido de pinhão ( $p < 0,05$ ). Este fato está relacionado à maior vibração das

moléculas do grânulo de amido sob altas temperaturas, o que causa o rompimento das ligações intermoleculares e permite que os sítios de ligação liberados possam realizar ligações de pontes de hidrogênio com a molécula de água (Fennema, 2000). De acordo com Hashim et al. (1992), durante a faixa de temperatura de gelatinização, o grânulo de amido tem um limitado inchamento onde somente uma pequena quantidade de carboidratos é solubilizada, mas a medida que a temperatura aumenta, acima da faixa de temperatura de gelatinização, existe um aumento do poder de inchamento e uma grande quantidade de carboidratos é lixiviada a partir do grânulo de amido. Para o amido de milho nativo, a influência da temperatura no poder de inchamento somente foi observada a partir de 50°C.

O incremento do poder de inchamento com a temperatura, para espécies nativas foi também observado por Waliszewski et al. (2003), para o amido de banana.

Ao contrário do que ocorreu com os amidos nativos, o poder de inchamento dos amidos modificados decresceu com o aumento da temperatura, sendo significativamente menor à 70°C. Isto pode estar relacionado com o fato de que, na hidrólise ácida, as cadeias que compõe o amido, principalmente a amilose, são fragmentadas e formam uma estrutura desorganizada que com o aumento da temperatura, não consegue reter água em seu interior (Sandhu et al., 2007).

Analisando as espécies nativas, pode-se verificar que à temperaturas de 25 e 60°C, ao contrário do relatado por Woisiacki e Cereda (1989), o amido de pinhão apresentou valores para o poder de inchamento menores ( $p < 0,05$ ) do que o amido de milho, enquanto que à 50°C nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o poder de inchamento das espécies. Entretanto, a 70°C o valor alcançado para o poder de inchamento do amido de pinhão foi maior do que para o amido de milho. Stahl et al. (2007) em seu estudo com amido de pinhão constatou que à 85°C o amido de pinhão nativo apresentou um poder de inchamento similar ao encontrado para o amido de milho. Henríquez et al. (2008) encontraram valores de 2,55 g H<sub>2</sub>O/g amido base seca , à 60°C para o amido da semente de *Araucaria araucana*, (conífera da família das araucárias típica de países como Chile e

Argentina). Este valor foi inferior ao encontrado para o amido de pinhão, na temperatura mais alta estudada (70°C).

Os amidos modificados de pinhão e milho apresentaram valores maiores do que os similares nativos para o poder de inchamento, sob as temperaturas de 25°C e 50 °C, enquanto que sob as temperaturas de 60 °C e 70 °C se observa a situação inversa. Essa última situação foi relatada por Sandhu et al.(2007) em sua avaliação da modificação ácida do amido de milho, o que segundo Laval (2004), se deve à redução da região amorfa do grânulo de amido, o que reduz o número de sítios disponíveis para estabelecimento de ligações com a molécula de água.

A diferença encontrada nos valores de poder de inchamento para espécies estudadas deve-se basicamente às suas diferentes porcentagens de amilose, amilopectina e tamanho e compactação de grânulos (Marcon et al., 2007). Estudos têm demonstrado que variações genéticas, condições climáticas e de solo, idade da cultura e época de colheita também afetam as características reológicas, principalmente viscosidade, poder de inchamento, retrogradação (Franco et al., 2001).

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para o índice de solubilização dos amidos nativos e modificados de pinhão.

**Tabela 21:** Índice de Solubilização dos amidos nativos de pinhão e milho em função da temperatura

Temperatura	Índice de Solubilização			
	Amido Pinhão	Amido Milho	Pinhão modificado	Milho Modificado
25°C	0,31 <sup>aA</sup> ± 0,04	0,71 <sup>bA</sup> ± 0,01	7,52 <sup>cA</sup> ± 0,12	6,87 <sup>dA</sup> ± 0,07
50°C	0,12 <sup>aB</sup> ± 0,01	1,48 <sup>bB</sup> ± 0,04	7,47 <sup>cA</sup> ± 0,12	6,93 <sup>dA</sup> ± 0,14
60°C	4,02 <sup>aC</sup> ± 0,20	2,98 <sup>bC</sup> ± 0,11	8,65 <sup>cB</sup> ± 0,02	8,11 <sup>dB</sup> ± 0,04
70°C	1,45 <sup>aD</sup> ± 0,09	2,85 <sup>bC</sup> ± 0,06	9,02 <sup>cC</sup> ± 0,05	8,19 <sup>dB</sup> ± 0,02

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão ( $n = 3$ ). Médias seguidas de letras minúscula diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Através da tabela, pode-se observar que às temperaturas de 25, 50 e 70°C, o valor encontrado para o índice de solubilização do amido de pinhão nativo foi menor que no milho, o que pode ser explicado devido ao menor conteúdo de amilose do amido de pinhão, já que segundo Marcon et al. (2007) a amilose, que deixa o grânulo com a entrada da água em seu interior, é quem contribui para o incremento do IS. Entretanto sob a temperatura de 60°C, o amido de pinhão apresentou IS (%) significativamente maior do que o milho. O incremento do IS (%) com a temperatura foi verificado para o amido de milho, entretanto para o amido de pinhão este fato não seguiu uma sequência lógica. Não foi encontrado nenhum relato a respeito deste resultado.

Henríquez et al. (2008) encontraram valores similares de IS(%) para a semente de Piñon (*Araucaria araucana*), sob temperatura de 30°C (0,3%).

Para os amidos modificados, de ambas as espécies, o IS foi significativamente maior do que o encontrado para os nativos. Este fato ocorre porque o ácido ataca preferencialmente a região amorfa da molécula de amido, onde a amilose reside, preferencialmente (Atichokudomchai et al., 2000), gerando uma significativa redução de seu conteúdo no grânulo e a consequente solubilização da mesma, acarretando em um aumento do IS. Este fato foi potencializado com o incremento da temperatura, para ambas as espécies. Ainda, pode-se perceber que o IS do amido de pinhão foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o encontrado para o amido de milho, demonstrando a maior susceptibilidade do pinhão, frente ao milho, à reação de hidrólise ácida.

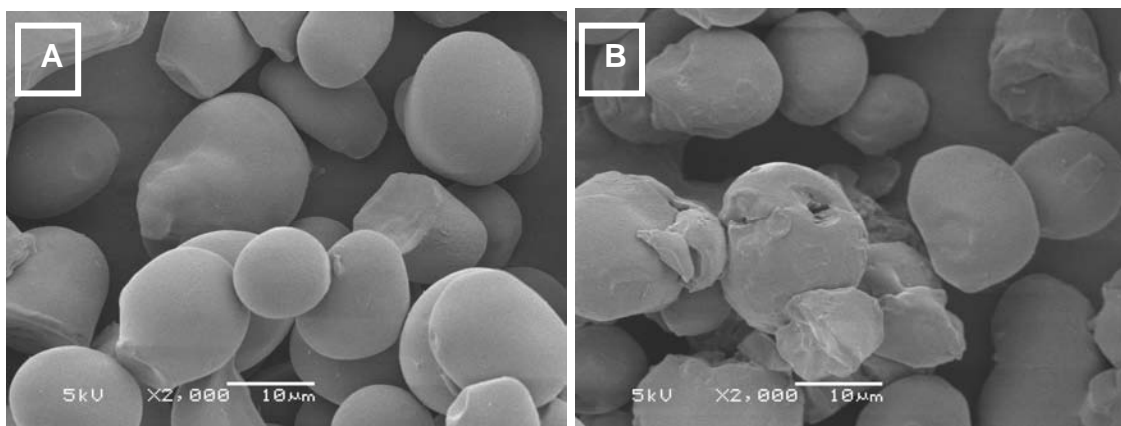
#### **4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos amidos nativos e modificados**

A Figura 29 apresenta as fotomicrografias obtidas através de MEV do amido de pinhão nativo e modificado.

Nela pode-se observar que o tratamento ácido afetou a estrutura dos grânulos do amido de pinhão, aumentando a porosidade e a forma da superfície, que na espécie nativa se encontra sem protuberâncias. Também se observa que a

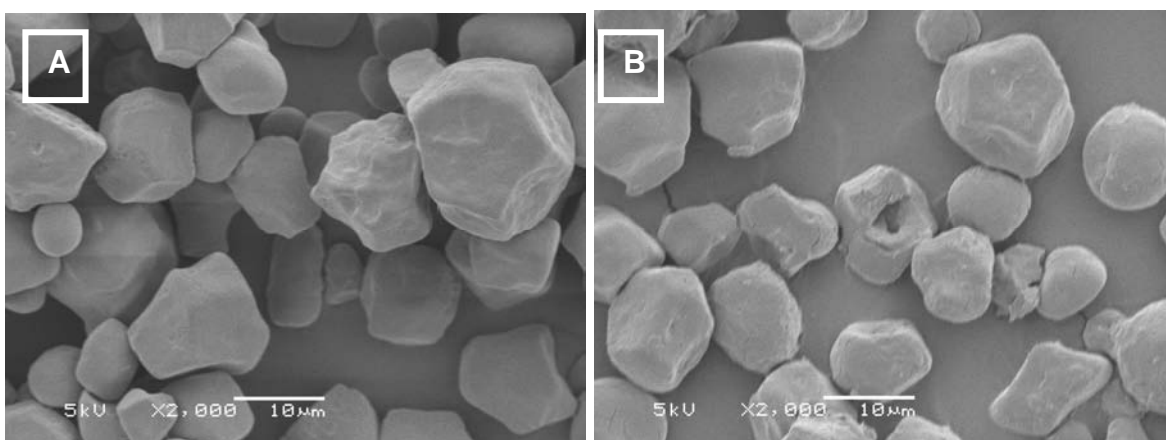
hidrólise não foi uniforme, pois alguns grânulos parecem mais afetados do que outros.

Esse fato confirma que a condição hidrólise ácida, no amido de pinhão não foi muito intensa, de acordo com o valor de DE encontrado de 6,5.



**Figura 29:** Micrografias obtidas através de MEV do amido de pinhão nativo e modificado, sendo A, pinhão nativo (2000x); B, pinhão modificado (2000x).

A Figura 30 apresenta as fotomicrografias do amido de milho nativo e modificado.



**Figura 30:** Micrografias obtidas através de MEV do amido de milho nativo e modificado, sendo A, milho nativo (2000x); B, milho modificado (2000x).

Assim como para o amido de pinhão, o amido de milho apresentou mudanças na estrutura dos grânulos, com uma superfície que apresenta “fendas” e com alguns poros. Este fato comprova que a hidrólise ácida realizada também afetou o grânulo do amido de milho.

Sandhu et al. (2007) não observaram destruição granular após a hidrólise ácida do amido de milho (50°C/0,14 M de HCl/8 horas), devido ao baixo grau de hidrólise gerado. You e Izydorczyk (2007) relataram que o amido de cevada, após hidrólise ácida, também não apresentou alterações na superfície granular. Observações similares também foram relatadas por Chang et al. (2006), Kuakpetoon e Wang (2001) e Lawal (2004) em estudos com amidos submetidos à modificação por hidrólise ácida.

#### **4.4.7 Propriedade de pasta**

A Figura 31 apresenta os viscoamilogramas agregados dos amidos nativos e modificados de milho e pinhão, sendo os valores de viscosidade máxima, viscosidade mínima, viscosidade final, quebra e setback apresentados na Tabela 22.

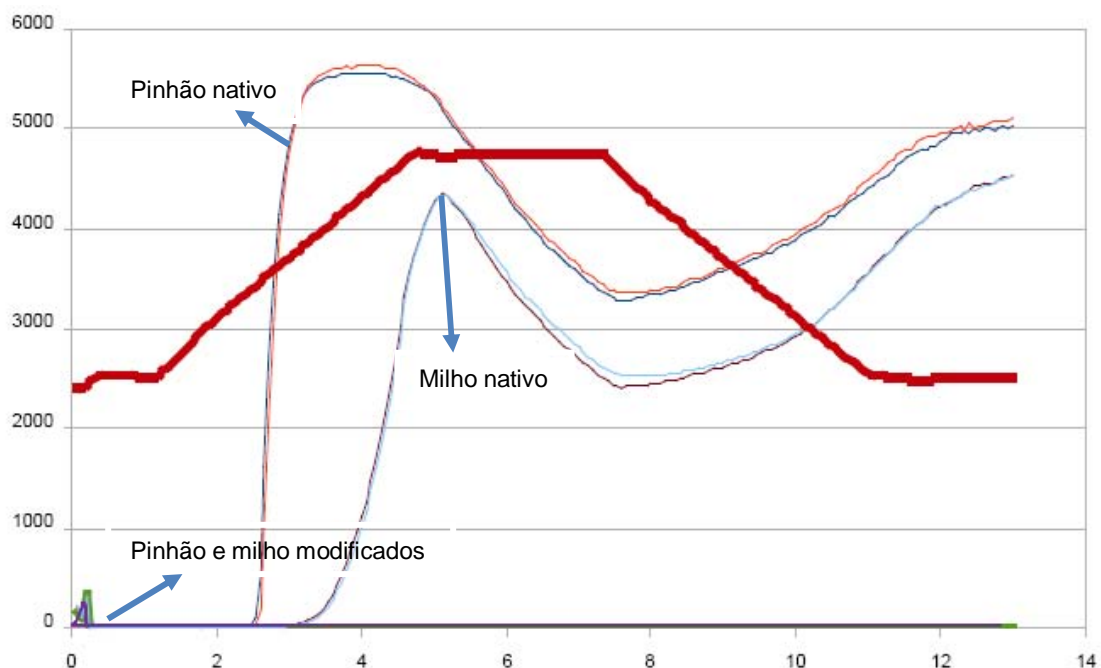


Figura 31: Viscoamilogramas agregados dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho.

**Tabela 22:** Propriedade de pasta dos amidos nativos e modificados de milho e pinhão

Amido	Temperatura de Pasta (°C)	Viscosidade Máxima (cP)	Viscosidade Mínima (cP)	Viscosidade Final (cP)	Breakdown ou quebra (cP)	Setback (cP)
Pinhão Nativo	68,0	5595,0 ± 48,08 <sup>a</sup>	3320,0 ± 48,08 <sup>a</sup>	5072,5 ± 40,31 <sup>a</sup>	2275,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	1752,5 ± 7,78 <sup>a</sup>
Milho Nativo	78,0	4347,0 ± 8,49 <sup>b</sup>	2468,0 ± 77,78 <sup>b</sup>	4534,5 ± 4,95 <sup>b</sup>	1881,0 ± 83,44 <sup>b</sup>	2067,5 ± 81,32 <sup>b</sup>
Pinhão Modificado	0,0	10,0 ± 1,41 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,5 ± 0,71 <sup>c</sup>	12,0 ± 1,41 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,00 <sup>c</sup>
Milho Modificado	0,0	57,0 ± 2,83 <sup>c</sup>	14,0 ± 1,41 <sup>c</sup>	18,0 ± 1,41 <sup>c</sup>	46,0 ± 2,83 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,71 <sup>c</sup>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão ( $n = 3$ ). Médias seguidas de letras minúscula diferentes na mesma comuna indicam diferenças significativas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Na figura pode-se perceber que o aumento da temperatura leva à gelatinização do amido, o que provoca o aumento da viscosidade, devido ao inchamento dos grânulos de amido. Nesse ponto, polímeros com menor massa molecular, particularmente amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos (Thomas e Atwell, 1999). A temperatura na qual os grânulos começam a inchar é denominada temperatura de pasta, que para o amido de pinhão nativo foi menor (68°C) do que para o amido de milho nativo (78°C), o que indica que o amido de pinhão apresenta menor resistência à dissociação das pontes de hidrogênio intramoleculares e maior facilidade de expansão do que o amido de milho (Leonel et al, 2005). Resultado similar foi encontrado por Bello-Pérez et al. (2006) e por Stahl et al. (2007) quando comparavam o amido de pinhão ao amido de milho.

Na temperatura de pasta, a viscosidade alcançada para o amido de pinhão foi de aproximadamente 3500 cP e para o amido de milho, de aproximadamente 3300 cP (valores obtidos diretamente do viscoamilograma). O pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também a presença de alguns grânulos intactos (Thomas e Atwell, 2007). A viscosidade máxima alcançada pelo amido de pinhão nativo (pico de viscosidade) foi maior (5595 cP) do que a obtida pelo amido de milho nativo (4347 cP) e as temperaturas na qual ocorreram estes picos de viscosidade foram de aproximadamente, 90°C para o amido de pinhão e 95°C para o amido de milho. Resultado muito similar foi encontrado por Stahl et al. (2007) que encontrou para o amido de pinhão nativo, 89,2 °C para a temperatura de pico de viscosidade, e para o amido de milho, 94°C. Entretanto, estes mesmos autores encontraram uma viscosidade de pico 34% maior para o amido de pinhão frente ao amido de milho e no presente trabalho, este aumento foi de apenas 14%, fato que pode estar associado à diferenças de cultivares utilizadas, condições experimentais e processo de extração do amido.

A viscosidade de pasta é importante na avaliação da qualidade do amido, uma vez que a fluidez pode interferir nos equipamentos a serem utilizados e dimensionados em uma linha de produção, até no produto a ser fabricado (Bello-Pérez et al.,2006). Nesse contexto, pode-se dizer que o amido de pinhão é uma

importante alternativa para o desenvolvimento de produtos que requerem alta viscosidade, sob temperaturas de processo não muito altas, assim como para produtos com ingredientes termolábeis.

Durante a fase de temperatura constante (95°C), os grânulos começam a se dissociar e a solubilização das moléculas de amilose continua, gerando a queda de viscosidade observada na Figura 31. A diferença entre as viscosidades máxima e mínima é denominado “*Breakdown*”, que representa a resistência do amido à agitação mecânica, onde é possível avaliar a estabilidade do amido em altas temperaturas, cujos grânulos se rompem sob agitação mecânica (Thomas e Atwell, 1999). O “*breakdown*” para o amido de pinhão nativo foi maior do que o obtido para o amido de milho nativo, o que, segundo Vieira (1994) revela a maior fragilidade do amido de pinhão quando cozido em água ou seja, menor resistência à agitação a quente.

Imediatamente após a etapa de redução da temperatura, para ambas as espécies, ocorre a reassociação entre as moléculas e a viscosidade aumenta, provavelmente devido à reorganização das cadeias lineares (principalmente amilose) do amido que foram solubilizadas durante o aquecimento e a fase de matimento da temperatura. Este processo produz um alto número de ligações cruzadas formando uma rede que retém uma grande quantidade de água em seu interior, o que representa o fenômeno de retrogradação.

O *setback* (tendência à retrogradação) para o amido de pinhão foi significativamente menor (1752,5 cP) do que o encontrado para o amido de milho (2067,5 cP) o que indica a maior estabilidade à retrogradação do amido de pinhão, fato que concorda com os resultados anteriormente discutidos nos itens 5.4.3 e 5.4.4. Também, segundo Yuan et al. (2007) maiores valores de *setback* são encontrados para amidos cujos grânulos possuem maior diâmetro, devido a maior fragilidade encontrada em grânulos maiores, o que concorda com o item 5.1.4 que aponta menores valores para o diâmetro do amido de pinhão (7 a 20 µm) frente ao amido de milho (21-96 µm) (Fennema, 2001).

Como pode ser visualizado pela Figura 31 e mensurado pelos dados da Tabela 22, as pastas de amido de pinhão e milho modificados apresentaram

valores de viscosidade muito baixos, pois o amido gelatinizado, para ambos os casos apresentou elevada fluidez. Esse fato concorda com o encontrado por Shandu et al. (2007) que relatou que para diferentes espécies de amido de milho ácido modificadas, uma drástica redução dos valores de viscosidade máxima, viscosidade final, “*breakdown*” e “*setback*” quando comparado ao amido nativo. De acordo com os mesmos autores a hidrólise ácida gera esta redução drástica no pico de viscosidade devido à redução das cadeias que compõem o amido.

De maneira geral, a reação de hidrólise ácida reduziu drasticamente a viscosidade de pasta a quente para os amidos analisados, o que concorda com a bibliografia (Whistler & Daniel, 1990). Cruz e El-Dash (1984) relataram que ao submeter o amido de chuchu e milho à hidrólise ácida, utilizando uma concentração de ácido clorídrico de  $0,075 \text{ mol.l}^{-1}$ , a viscosidade máxima foi reduzida em aproximadamente 50%, tornando a pasta de amido mais fluida. Porém, os mesmos autores relataram que quando a modificação ácida foi realizada com uma concentração maior de ácido clorídrico ( $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ ) esta redução foi de aproximadamente 100%. Isto confirma o fato de que quanto maior a concentração de ácido clorídrico utilizada, maior é a severidade da reação (o que concorda com o resultado apresentado no item 5.3), e conseqüentemente, maior é a diferença das características adquiridas, no caso, a redução da viscosidade de pasta a quente. Da mesma forma, Silva et al. (2006), em seu estudo sobre amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil, demonstraram que as viscosidades máximas de amidos modificados por hidrólise ácida, foram de 100 a 75% menores do que as viscosidades máximas encontradas para os amidos nativos. Da mesma forma, Sriroth (2002), em seu estudo com amido de mandioca ácido modificado relatou uma drástica redução no valor da viscosidade máxima do amido nativo (~4000 cP) com relação ao amido ácido modificado (~30 cP).

Estudos utilizando outros protocolos de modificação da molécula de amido também alcançaram redução de viscosidade de pasta à quente. Stahl et al. (2007), em seu estudo com amido de pinhão e milho submetidos à fosfatação (12% de substituição), obtiveram uma redução total do pico de viscosidade obtido. Já, Limberger et al. (2008) demonstraram, com a mesma técnica de fosfatação

(grau de substituição de 7,5%), que o amido de quirera de arroz obteve uma redução de 26% na viscosidade máxima. Henrique et al.(2008) relataram que o amido de mandioca modificado via esterificação gerou uma redução de 90% da viscosidade de pico em relação ao amido nativo.

Os menores valores de *breakdown* e *setback* encontrados para o amidos modificados de pinhão e milho sugerem tanto maior estabilidade à agitação mecânica, quanto a sua menor tendência à retrogradação, quando comparados aos similares nativos. Ao se comparar os amidos modificados de pinhão e de milho, pode-se concluir que a reação ácida foi mais drástica para o amido de pinhão (modificação mais intensa), visto que proporcionou um pico de viscosidade muito menor, além disso o amido modificado de pinhão é menos susceptível à retrogradação do que o modificado de milho, resultado que concorda com o apresentado na análise de determinação da tendência à retrogradação.

A característica de baixa tendência à retrogradação, aliada aos baixos valores de viscosidade de pasta indicam, segundo Henrique et al. (2008), uma potencial aplicabilidade do amido de pinhão modificado para a formação de filmes biodegradáveis comestíveis (biofilmes) que têm como finalidade a proteção de produtos embalados (alimentícios ou não) de danos físicos e biológicos, aumentando a sua vida útil.

#### **4.4.8 Determinação das propriedades térmicas e termodinâmicas**

A Figuras 32 apresenta os termogramas obtidos pela análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), para os amidos de pinhão nativo (A), milho nativo (B), pinhão modificado (C) e milho modificado (D), cujos parâmetros, temperatura de pasta, temperatura inicial de gelatinização ( $T_o$ ), temperatura do pico endotérmico ( $T_p$ ), temperatura de conclusão da gelatinização ( $T_c$ ), faixa de gelatinização ( $T_c - T_o$ ) e entalpia de gelatinização ( $\Delta H_{gel}$ ) são apresentados na Tabela 23 (os marcadores indicam as temperaturas inicial, do pico endotérmico e de conclusão, da menor para a maior temperatura).

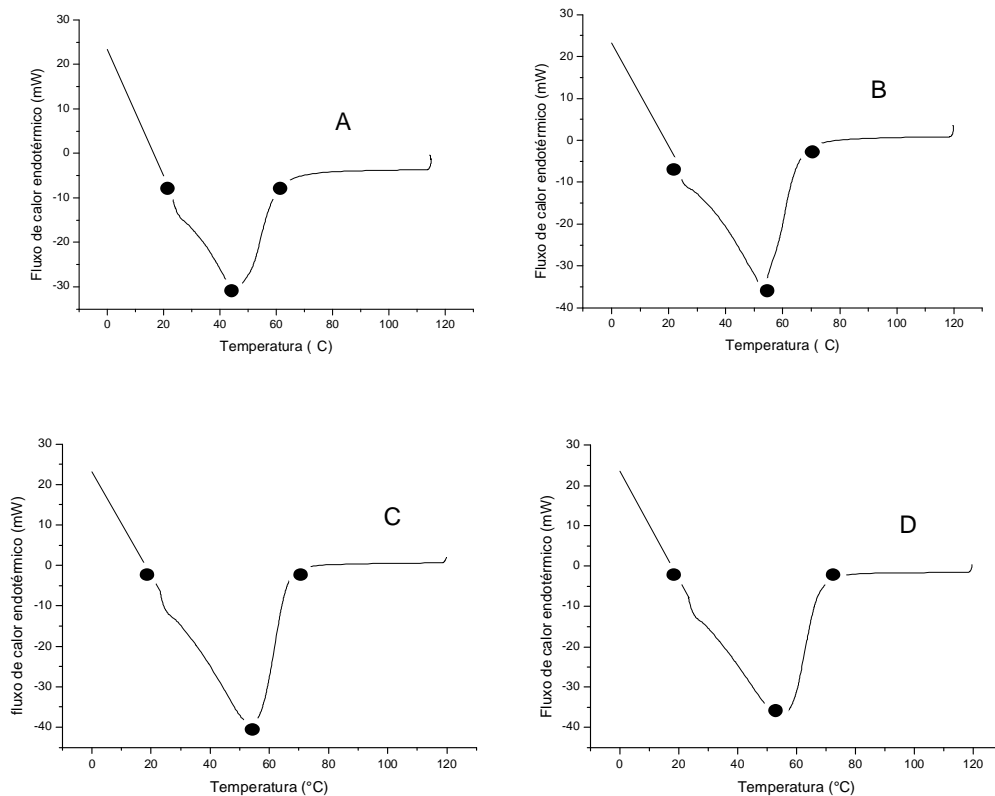


Figura 32: Termogramas obtidos através de DSC dos amidos nativos de pinhão, safra 2007 (A) e milho (B) e modificados via hidrólise ácida (44°C e 3,2 mol.l<sup>-1</sup> de HCl) de pinhão (C) e milho (D).

Tabela 23: Propriedades térmicas e termodinâmicas dos amidos nativos e modificados de pinhão e milho

Espécie	T <sub>o</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>gel</sub> (J.g <sup>-1</sup> )
Pinhão Nativo	18,76	47,64	62,52	15,23
Pinhão Modificado	21,34	53,10	67,02	14,52
Milho Nativo	18,84	53,78	68,25	13,85
Milho Modificado	19,07	54,17	69,82	18,30

Através da figura e da tabela, em relação às espécies nativas, se observa que a temperatura de pico endotérmico do amido de pinhão é menor do que a

encontrada para o amido de milho. Bello-Pérez et al. (2006) apontaram um maior valor para a  $T_p$  do amido de pinhão (63,4°C) do que a encontrada no presente trabalho (47,64°C). Contrariamente ao encontrado pelos autores, a  $\Delta H_{gel}$  do amido de pinhão nativo encontrado no presente trabalho foi maior do que a  $\Delta H_{gel}$  do amido de milho nativo, o que indica, segundo Biliaderis (1991), que a desorganização dos componentes do amido de pinhão requer mais energia, comparado ao amido de milho. Este fato concorda com Louchi et al. (1984) que indica que amidos que possuem menor conteúdo de amilose, como o pinhão (23,6%), frente a ~30% do milho) possuem maiores valores de  $\Delta H_{gel}$ . Ainda, o mesmo autor relatou menor entalpia de gelatinização (8,0 J.g<sup>-1</sup>) para o amido de pinhão à aqui encontrada (15,23 J.g<sup>-1</sup>).

De acordo com Franco et al. (2002), os parâmetros térmicos são influenciados pelas forças de ligação no grânulo, a qual variam de acordo com a espécie. Estas forças, segundo os mesmos autores estão relacionadas à composição do grânulo (razão amilose/amilopectina, conteúdo de fósforo, lipídios, enzimas e proteínas presentes), estrutura molecular da amilopectina (razão entre regiões cristalinas e amorfas), morfologia do grânulo e distribuição de tamanhos dos grânulos de amido. Ainda, Ellis et al. (1998) relata que as condições do meio afetam diretamente o genótipo da planta, o que pode acarretar em diferenças nas características térmicas e funcionais de plantas de mesma espécie, o que pode ter explicado as diferenças encontradas no estudo de Bello-Pérez et al. (2006) e neste.

A entalpia de gelatinização do amido de milho foi próxima à encontrada pela literatura, que varia entre 7,5 a 14 J.g<sup>-1</sup> (Metler Toledo, 2007; Mestres, 1996; Bello-Pérez, 2006).

Em ambos amidos modificados pode-se perceber o aumento na temperatura de gelatinização ( $T_p$ ). O tratamento ácido ataca preferencialmente a região amorfa do grânulo, gerando a decomposição e desestabilização dos cristais do grânulo, pela parte amorfa, o que acarreta em maiores temperaturas de gelatinização (Garcia et al., 1996; Hoover, 2000; Jenkins & Donald, 1997). Da mesma forma, os valores de  $T_o$  e  $T_c$  dos amidos modificados foram maiores aos

encontrados para os amidos nativos. Este fato, segundo Tester e Morrison (1990) indica que os amidos modificados possuem um nível mais alto de cristalinidade do que os amidos nativos, o que está de acordo com o fato de que o ácido ataca preferencialmente a região amorfa do grânulo, aumentando a fração da região cristalina.

A  $\Delta H_{gel}$  do amido de pinhão modificado foi menor à encontrada para o pinhão nativo. Segundo Blanshard (1987) a redução do  $\Delta H_{gel}$ , após hidrólise ácida, ocorre pois o ácido ataca em primeiro lugar, a região amorfa do grânulo e esta região tem um importante papel na termodinâmica da gelatinização. Decréscimo similar no valor de entalpia, após tratamento ácido foi apresentado por outros autores (Wang e Wang, 2001; Wang et al., 2003). Muhr et al. (1984) atribuem o fato à perda de ordem da região amorfa, antes à gelatinização.

Para o amido de milho modificado, o fato da sua  $\Delta H_{gel}$  ser menor à encontrada para o amido nativo, discorda ao encontrado por outros autores (Stahl et al., 2007; Wang et al., 2003) que relatam maiores valores desta propriedade para o amido nativo. Esse comportamento pode ser explicado pela menor susceptibilidade do amido de milho, frente ao amido de pinhão, à reação de hidrólise ácida, conforme constatado pela análise de Índice de Solubilidade (item 5.4.5) e pelo menor pico de viscosidade do amido de pinhão modificado, gerado pela maior susceptibilidade do amido de pinhão frente ao amido de milho, (item 5.4.7).

## 5 CONCLUSÕES

O rendimento do pinhão em amido, para todos os protocolos de extração testados foi de aproximadamente 40% (sem diferença significativa entre os mesmos).

A extração alcalina foi mais eficaz no processo de desproteínização do amido, assim como na eliminação de lipídeos aderidos ao grânulo, entretanto estas alteram a estrutura dos grânulos, o que se relaciona à formação de complexos NaOH-amido ou à gelatinização parcial dos grânulos, sendo este efeito potencializado pela concentração da solução alcalina.

A extração com água mostrou ser a mais viável tecnologicamente, pois não alterou as características estruturais do grânulo, embora a quantidade de proteínas residuais no grânulo tenha sido superior, quando comparada à extração alcalina.

Os grânulos do amido de pinhão possuem estrutura do tipo C e variadas formas nas quais coexistem tanto grânulos ovais, quanto elipsóides truncados ou hemisféricos, apresentando uma superfície lisa. O diâmetro médio varia entre 7 e 20  $\mu\text{m}$ . Sob luz polarizada, o grânulo do amido de pinhão apresentou birrefringência característica (Cruz de Malta) até a temperatura de aproximadamente 50,3°C.

Os modelos que melhor se ajustaram aos dados experimentais de isotermas de amido de pinhão foram: Peleg, Chung–Pfof e GAB. O modelo de GAB foi empregado para determinar as propriedades termodinâmicas: calor de sorção (entalpia diferencial) e entropia diferencial. A isoterma do tipo II foi evidenciada.

A sinerese do amido de pinhão foi significativamente menor do que a do amido de milho após refrigeração (5°C) por 28 dias, indicando que o amido de pinhão nativo é menos propenso à retrogradação do que o amido de milho nativo.

O planejamento experimental realizado para modificação ácida do amido de pinhão indicou que a temperatura, a concentração de ácido e a interação entre



estes afeta significativamente o grau de hidrólise do amido, que é maximizado para as condições de 44°C e 3,2 mol.l<sup>-1</sup> com valor de DE de 6,5, onde observou-se a formação de gel termorreversível.

As análises comparativas dos amidos nativos e modificados de pinhão e de milho indicaram que: (1) todos os amidos formaram gel, entretanto somente os modificados termorreverteram; (2) a modificação ácida do amido causou um aumento na porcentagem de transmitância de luz para os amidos de pinhão e milho, para tempos de armazenamento similares, o que se traduz em uma menor tendência à retrogradação gerada pelo tratamento ácido; (3) o amido de pinhão nativo possui menor tendência à sinerese, durante armazenamento sob refrigeração e maior estabilidade aos ciclos de congelamento e descongelamento do que o amido de milho; (4) os amidos modificados apresentaram baixa estabilidade frente ao congelamento e descongelamento, o que indica que a hidrólise ácida não incrementa a estabilidade de amidos frente a esta condição de processo.

A temperatura influi significativamente no poder de inchamento (capacidade de retenção de água) dos amidos nativos e modificados e sob temperaturas de 60 e 70 °C, os amidos modificados apresentaram menor PI do que os nativos. O valor encontrado para o índice de solubilidade (IS) (%) do amido de pinhão nativo foi menor ao encontrado para o amido de milho a 25°, 50° e 70°C, sendo o IS dos amidos modificados maior do que o dos amidos nativos, nas temperatura estudada.

A hidrólise ácida realizada mostrou afetar a superfície dos grânulos dos amidos de pinhão e milho, entretanto não drasticamente. Esta alteração granular não foi uniforme para o amido de milho, o que sugere que a reação não alcançou um grau de hidrólise muito alto.

A viscosidade máxima alcançada pelo amido de pinhão nativo (pico de viscosidade) foi maior (5595 cP) do que a obtida pelo amido de milho nativo (4347 cP) e as temperaturas na qual ocorreram estes picos de viscosidade foram de aproximadamente, 90°C e 95°C, respectivamente. O *breakdown* para o amido de pinhão nativo foi maior do que o obtido para o amido de milho nativo, o que revela

a maior fragilidade do amido de pinhão quando cozido em água, ou seja, menor resistência a agitação a quente. O *setback* (tendência à retrogradação) para o amido de pinhão foi significativamente menor (1752,5 cP) do que para o amido de milho (2067,5 cP) o que indica a maior estabilidade à retrogradação do amido de pinhão, frente ao do milho. A reação de hidrólise ácida reduziu drasticamente (quase em 100%) a viscosidade de pasta a quente dos amidos analisados.

A temperatura de pico endotérmico ( $T_p$ ) do amido de pinhão nativo (47,64 °C) foi menor do que a encontrada para o amido de milho nativo (53,78 °C) e o  $\Delta H_{gel}$  do amido de pinhão (15,23 J.g<sup>-1</sup>) foi maior do que a  $\Delta H_{gel}$  do amido de milho (13,85 J.g<sup>-1</sup>), o que indica que a desorganização dos componentes do amido de pinhão requer mais energia. Após a reação de hidrólise ácida, para ambas as espécies nativas, ocorreu um aumento na temperatura de gelatinização ( $T_p$ ) de 47,64 °C a 53,10 °C para o pinhão e de 53,78 °C a 54,17 °C, para o milho. A  $\Delta H_{gel}$  do amido de pinhão modificado foi menor à encontrada para o pinhão nativo, o contrário foi encontrado para o amido de milho, evidenciando a menor susceptibilidade do amido de milho frente ao amido de pinhão, à hidrólise ácida.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O amido de pinhão extraído no presente trabalho apresentou um alto grau de pureza e propriedades funcionais diferenciadas frente a amidos nativos comumente utilizados na indústria. Entretanto, a dificuldade do descascamento da semente crua e a reduzida área de plantio da espécie comparativamente a outras fontes de amido, como o milho, por exemplo, são fatores limitantes para a sua utilização em maior escala.

Sendo assim, o seu uso na forma nativa é justificado quando se consideram aplicações que requerem menores quantidades de material, como a produção de embalagens ativas biodegradáveis ou a sua utilização como veículos em fármacos. Ainda pode-se dizer que, depois de hidrolisado, o amido de pinhão, através da sua capacidade de termorreversão e seu alto ponto de fusão, tem potencial aplicabilidade para a substituição parcial da gordura em formulações alimentícias ou farmacêuticas, quando em pequenas quantidades.

Para tais afirmações, inicialmente, uma melhor avaliação do processo de extração do amido de pinhão deve ser realizada, visando a mecanização do processo de retirada da casca ou a sua extração química pela utilização de solventes, como é o caso do processo de lixiviação de frutas. Posteriormente, estudos visando a avaliação do desempenho do material amiláceo frente a estas aplicações devem ser realizados, a fim de apontar as vantagens e desvantagens do uso do amido de pinhão na indústria farmacêutica, de alimentos e até mesmo química.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: fat replacers. (2005). *Journal of American Dietetic Association*, 105, 266-275.

AGBOOLA, S. N.; Mills, D. (2005). Characterisation and functional properties of AJIBOLA, O.O.; AVIARA, N.A.; AJETUMOBI, O.E. Sorption equilibrium and thermodynamic properties of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Engineering*, 58, 317-324.

AKOH,C.C. (1998). Fat replacer. *Food Technology*., Chicago, 52, 47-53.

ALBRECHT,J.J.;NELSON,A.I.;STAINBERG,M.P.(1960) Characteristics of corn starch and starchs derivatives as affected by freeze storage and thawing. *Food Technology*,14,1,57-60.

ALEXANDER, R.J.. (1996).New starches for food aplications. *Cereal Foods World*, 41, 10, 796-799.

ALMEIDA,M. (1990). Dietético:nova lei. *Nutri News*, Rio de Janeiro, n.148, p.10-12, 1997.

AL-MUHTASEB, A.H.; MCMINN, W.A.M.; MAGEE, T.R.A. (2004 a). Water sorption isotherms of starch powders Part 2: Thermodynamic characteristics. *Journal of Food Engineering*, 62. 135-142.

AL-MUHTASEB, A.H.; MCMINN, W.A.M.; MAGEE, T.R.A. (2004 b). Water sorption isotherms of starch powders Part 1: Thermodynamic characteristics. *Journal of Food Engineering*, 61, 297-307.

ALTAY,F.;GUNASEKARAN,S.(2006). Influence of Drying temperature, water content, and heating rate on gelatinization of corn starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54,4235-4245.

AMERICAN MAIZE PRODUCTS COMPANY (1992). Method for making a reduced fat product. *Food Science and Technology abstracts*.

ANNISION, G.; TOPPING, D. L. (1994). Nutritional role of resistant starch: chemical, structure vs physiological function. *Annual Review Nutrition*, 14,297-320.

AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis* 16<sup>th</sup>ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

AROGBA, S.S. (2001). Effect of temperature on the moisture sorption isotherm of a biscuit containing processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour. *Journal of Food Engineering*, 48. 121-125.

ARSLAN, N.; TOGRUL, H. (2006). The fitting of various models to water sorption isotherms of tea stored in a chamber under controlled temperature and humidity.

ASCHERI, D.P.R. (1992). Acompanhamento do processo fermentativo através das características do polvilho e dos biscoitos elaborados. Lavras, ESAL, 92 (Tese de Mestrado).

ATICHOKUDOMCHAI, N.; SHOBSNGOB, S.; CHINACHOTI, P.; VARAVINIT, S. (2000). A study of some physicochemical properties of high-crystalline tapioca starch. *Starch/Starke*, 53, 577–581.

ATWELL, W.A.; HOOD, L.F.; LINEBACK, D.R.; VANIANSMARSTON; ZOBEL, H.F.. (1998). The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Food World*. 33, 306-311.

AYOUB, A.; OHTANI, T.; SUGIYAMA, S. (2006). Atomic force microscopy investigation of disorder process on rice starch granules surface. *Starch/Stärke*, 58, 475 – 479.

AYRANCI, E.; DUMAN, O. (2005). Moisture sorption isotherms of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and its protein isolate at 10, 20 and 30°C. *Journal of Food Engineering*, 70. 83-91.

BALDWIN, P.M.; DAVIES, M.C.; MELIA, C.D.(1997). Starch granule surface imaging using low-voltage scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Int. Journal of Biological Macromolecules*, 21, 103-107.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. (1989). An introduction to rheology. Elsevier Science Publishers.

BARROS, R.B.. (1984). Obtenção de amido e seus derivados. Refinações de Milho Brasil Ltda. 35p.

BELLO-PEREZ, L.A.; GARCÍA-SUÁREZ, F.J.; MÉNDEZ-MONTEALVO, G.; NASCOMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; CORNENUNSI, B.R..(2006). Isolation and Characterization of Starch from Seede of *Araucaria brasiliensis*: A novel Starch for Application in Food Industry. *Starch/Stärke*, 58, 283-291.

BEMILLER, J. N. (1997). Starch modification: Challenges and prospects. *Starch/Stärke*, 49, 127–131.

BERMUDEZ, J.J.H. (1997). Valorización de las amiláceas “no cereales” cultivadas en los países andinos: Estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de SUS almidones y de La resistencia a diferentes tratamientos estresantes.

Colombia: Facultad de Ingenieria de los Alimentos. Universidad de Bogotá. 150p. Trabajo de Grado.

BEST,D. (1991). Getting more from less: The challenges of FAT substitution. *Prepared Foods*, 190, 72-77.

BILIADERIS, C. G. (1982). Physical characteristics, enzymatic digestibility, and structure of chemically modified smooth pea and waxy maize starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 925-930.

BILIADERIS, C. G. (1991). The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69, 60-78.

BILIADERIS, C.G.; GRANT,D.R.;VOSE,J.R.(1981) Structural characterization of legume starches. II Studies on acid-treated starches. *Cereal Chemistry*, 5,481-566.

BLAHOVEC,J.(2004). Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. *Journal of Food Engineering*, 65, 489-495.

BLANSHARD,J.M.V.; FRAZIER,P.J.; GALLIARD,T. (1987). Chemistry and physics of baking. The Royal Society of Chemistry, 276.

BOCHI, V.C., LOBATO, L.P., STAHL, J.A., EMANUELLI, T., COSTABEBER, I., KUBOTA, E. (2002). Avaliação da capacidade de ligação à água e cor do gel do amido de pinhão modificado por fosfatação. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, SBCTA, Porto Alegre, 2582-2585.

BOGRACHEVA, T.Y.; MORRIS, V.J.; RING,S.G.; HEDLEY,C.L. (1998) *Biopolymers*, 45. 323-332.

BONIFÁCIO,W.;BARROZO,M.A.;SARTORI,D.J.M.(1993). Isotermas de umidade de equilíbrio para soja. In: Encontro sobre escoamento em meios porosos. Ouro Preto, MG. **Anais...** UFMG, 2,443-453.

BRASIL. Resolução nº12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Aprova as normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas à alimentos (e bebidas). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, jul.1978. Seção 1, pt I.

BULÉON, A.;COLONNA,P.; PLANCHOT,V.; BALLS,S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Biomacromolecules*, 23. 85-112.

CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS,A.M.(1996) Alimentos para fins especiais: dietéticos. 1ed. São Paulo: Livraria Varela, 400p.

CARDOSO, M. B., SAMIOS, D., SILVEIRA, N. P., RODEMBUSCH, F. S., & Stefani, V. (2007). ESIPT-exhibiting protein probes: A sensitive method for rice

proteins detection during starch extraction. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6, 99–102.

CARDOSO, M. B., SAMIOS, D.,; SILVEIRA, N. P. (2006). Study of protein detection and ultrastructure of Brazilian rice starch during alkaline extraction. *Starch/Starke*, 58, 345–352.

CARDOSO, M.B.; PUTAUX, J.L.; SAMIOS, D.; SILVEIRA, M.P (2007b). Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 6, 455-465.

CARDOSO, M.B.; PUTAUX, J.L.; SAMIOS, D.; SILVEIRA, M.P. (2007a). Influence of NaOH concentration in the alkaline extraction of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 3, 655-663.

CASSINI, A.S., MARCZAK, L.D.F., & NOREÑA, C.P.Z. (2006). Water adsorption isotherms of texturized soy protein. *Journal of Food Engineering*, 77, 194-199.

CEREDA, M.P. (1983). Determinação de viscosidade da fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). *Boletim da Sociedade de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17, 15-24.

CHANG, Y.; LIN, J.H.; HANG, S.Y. (2006). Physicochemical properties of waxy and normal corn starches treated in different anhydrous alcohols with hydrochloric acid. *Food Hydrocolloids*, 20, 332–339.

CHUNG, D.S.; PFOST, H.B. (1976). Part I: Heat and free energy changes of adsorption and desorption. *Transactions of the ASAE*, 549-555.

CLADERA-OLIVERA, F.; PETERMANN, A.C.; NOREÑA, C.P.Z.; WADA, K.; MARCZAK, L.D.F. (2008). Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 900–907.

CLADERA-OLIVERA, F., NOREÑA, C.P.Z.; WADA, K.; MARCZAK, L.D.F.; BRANDELLI, A. (2008a). Estudos tecnológicos e de engenharia para o armazenamento e processamento do pinhão. TESE DE DOUTORADO. Programa de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 193p.

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

CRAIG, S.A.S.; MANINGAT, C.G.; SEIB, P.A.; HOSENEY, R.C. (1989). Starch paste clarity. *Cereal Chemistry*, 66, 173-182.

- CRUZ,R., EL-DASH,A.A.M. (1984). Amido de Chuchu (*Sechium edule*, Swartz): Efeito da Modificação àcida em sua Viscosidade. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(3), 271-280.
- DE JONG, G.I.W.; VAN DEN BERG, C.; KOKELAAR, A.J. (1996). Water vapour sorption behaviour of original and defatted wheat gluten. *International Journal of Food Science and Technology*, 31. 519-526.
- DELGADO,A.E.; DA-Wen Sun (2002). Desorption isotherms for cooked and cured beef and pork. *Journal of Food Engineering*, 51,163-170.
- DONOVAN,J.W.; BERKELEY,J.M. (1980).Multiple phase transitions of starches and Nageli amyloextrins. *Starch/Starke*. 32, 190-194.
- ELLIS,R.P.;COCHRANE,M.P.;DALE,M.F.B.;DUFFUS,C.M.;LYNN,A.;MORRISON,I. M.; PRENTICE,R.D.M.; SWANSTON,J.S.; TYLLER,S.A. (1998). Starch Production and Industrial Use. *Journal Science of Food Agricultural*. 77, 289-311.
- ERBAS, M.; ERTUGAY, M.F.; CERTEL, M. (2005). Moisture adsorption behaviour of semolina and farina. *Journal of Food Engineering*, 69. 191-198.
- FELLOWS, J.P. (2006)Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática. 2ª ed., Porto Alegre: Artmed.
- FENNEMA, O. *Química de los Alimentos*. 2ª Ed. Editorial Acribia. Espanha, 2000. 1258p.
- FRANCO,C.M.L.;DAIUTO,E.R.;DEMIATE,I.M.;CARVALHO,L.J.C.B.;LEONEL,M.; CEREDA,M.P.;VILPOUX,O.F.;SARMENTO,S.B.S. (2002). Culturas de Tuberosas amiláceas latino americanas-Propriedades gerais do amido. Fundação Cargill, Campinas.
- FREITAS, M.C.J. (2002). Amido resistente: propriedades funcionais. *Nutrição Brasil*.1, .40-49.
- FRENCH,D. (1973).Chemical and Physical Properties of Starch. *Journal of Animal Science*. 37, 1048-1061.
- FURKSIK,S.L.; MAURO,D.J.; KORNACKI,L.;FARON,E.J.; TURNAK,F.L.; OWEN, R. (1992). Method for making a reduced fat product. *Food Science and Technology*, 4,981-709.
- GABAS,A.L.; TELIS,V.R.N.; SOBRAL,P.J.A.; TELIS-ROMERO,J.(2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*, 82, 246-252.



GALLANT,D.J.; BEWA,H.;BUY,Q.H.; BOUCHET,B.; SZYLIT,O.; SEALY,L. (1997) On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. *Starch/Starke*. 34, 255-262.

GARCIA,V., COLONNA,P., LOURDIN,D.,BULEON,A., BIZOT,H., OLLIVON,M. (1996). Thermal transitions of cassava at intermediate water contents. *Journal of Thermal Analysis*, 47, 1213-1228.

GERARD, C.; COLONNA, P.; BULEON, A.; PLANCHOT, V. (2002). Order in maize mutant starches revealed by mild acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 48, 131–141.

GUILLERMO, H., FISZMAN, S.(2005). Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. 1 ed. Valencia: Martín Impresores,111p.

HASHIM, D.B. (1992).The effect of low levels of antioxidants on the swelling and solubility of cassava starch. **Starch/Stärke**, v.44, n.3, p.471-475.

HEBRARD,A.;OULAHNA,D.;GALET,L.;CUB,B.;ABECASSIS,J.;FAGES.J.(2003).Hydration properties of durum wheat semolina:Influence of particle size and temperatura. *Powder Tecnology*,130,211-218.

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

HERMANSSON,A.M.,& SVEGMARK,K. (1996).Developments in the understanding of starch functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 345 - 53.

HORCAS, I.; FERNANDEZ, R.; GOMEZ-RODRIGUEZ, J.M.; COLCHERO, J.; GÓMES-HERRERO, J.; BARO, A.M.(2007). WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review Science Instrumental*, 78, Art. No. 013705.

HOOVER, R. (2000). Acid treated starches. *Food Research International*, 16,369-392.

HOOVER, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 49, 63-70.

HOOVER, R. (2000). Acid-treated starches. *Food Review International*, 16, 362-377.

HOSSAIN, M.D.; NBALA, B.K.; HOSSAIN, M.A.; MONDOL, M.R.A. (2001). Sorption isotherms and heat of sorption of pineapple. *Journal of Food Engineering*, 48, 103-107.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ.(1985). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ed. São Paulo, 1 – Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.

IOUCHI, N.; GLOVER, D. V.; SUGIMOTO, Y.; FUWA, H. (1984). Developmental changes in starch properties of several endosperm mutants of maize. *Starch/Stärke*, 36, 8–12.

ISHIGURO,K.; NODA,T.; KITAHARA,K.(2000). Retrogradation of sweet potato starch. *Starch*, 52,13-17.

JACOBS, H.; EERLINGEN, R. C.; ROUSEU, N.; COLONNA, P.; DELCOU; J. A.(1998). Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. *Carbohydrate Research*, 308, 359–371.

JANE, J.; KASEMSUWAN,T.; LEAS,S.; IA,A.; ZOBEL, H.; ROBYT, J.F.(1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stärke*, 46, 322-345.

JANE, J.;WONG, K.-S.; MCPHERSON, A. E. (1997). Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*, 30, 219–227.

JAYAKODY,L. E HOOVER,R. (2002). The effect of linnrization on cereal starch granules. *Food research International*, 35, 665-680.

JENKINS,P.J.; CAMERON,R.E.; DONALD, A.M.(1993). A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 45, 12,417-420.

JENKINS,P.J.; DONALD, A.M.(1997). The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure. *Starch/Stärke*, 49, 262-267.

JOHN,J.K., RAJA,K.C.M., RANI,S., MOORTHY,S.N., ELIASSON,A. (2002). Properties of arrowroot starch treated with aqueous HCl at ambient temperature. *Journal of Food Science*, 67, 10-14.

JOHNSON, P.N.T.; BRENNAN, J.G. (2000). Moisture sorption isotherm characteristics of plantain (*Musa*, AAB). *Journal of Food Engineering*, 44, 79-84.

KAYMAK-ERTEKIN, F.; GEDIK, A. (2004). Sorption isotherms and isosteric heat of sorption for grapes, apricots, apples and potatoes. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37, 429-438.

KIM, Y.S.; WIESENBERN, D.P.; GRANT, L.A. (1996). Pasting and thermal properties of potato and bean starches. *Starch/Starke*, 49, 97-102.

KOMIYA, T.; YAMADA, T.; NARA, S. (1987). Crystallinity of acid treated corn starch. *Starch/Stärke*, 39, 308-311.

KOMIYA, T.; NARA, S. (1986). Changes in crystallinity and gelatinization phenomenon of potato starch by acid treatment. *Starch/Stärke*, 38, 9-13.

KUAKPETOON, D., e WANG, Y.J. (2001). Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. *Starch/Starke*, 53, 211–218.

LABUZA, T.P. (1975). Sorption Phenomena in Foods. *Food Technology*, 22, 268-272.

LAHSASNI, S.; KOUHILA, M.; MAHROUZ, M. (2003). Adsorption-desorption isotherms and heat of sorption of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica*). *Energy Conversion and Management*, 45, 249- 261.

LAUZARDO, A. N.H ; G. MENDEZ-MONTEALVO, M. DEL VALLE, J.V.; SOLORZA-FERIA, L. A. BELLO-PÉREZ (2004). Iso-lation and partial characterization of Mexican *Oxalis tuberosa* starch. *Starch/Stärke*, 56, 357–363.

LAWAL, O.S. (2004). Composition physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidized, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. *Food Chemistry*, 87, 205-218.

LEHN, D.N.; PINTO, L.A.A.. (2004). Isotermas de equilíbrio e curvas de secagem para arroz em casca em silos de armazenagem. *Engenharia na Agricultura*, 12(3), 177-191.

LEONEL, M.; CÂMARA, F.L.A.; CEREDA, M.P. (2000). Processamento industrial de araruta (*maranta arundinacea*) para produção de fécula fermentada – um estudo de caso. In: Simpósio em Energia na Agricultura. Botucatu. Anais... Botucayu: Faculdade de Ciências Agrinômicas/Universidade Estadual Paulista, p.312-321.

LEONEL, M.; SARMENTO, S.B.S.; CEREDA, M.P.; CÂMARA, F.L.A. (2003). Extração e caracterização de amido de jacatupé (*Pachyrhizus ahipa*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(3), 362-365.

LEONEL, M.; GARCIA, A.C.B.; REIS, M.M. (2004). Caracterização físico química e microscópica de amido de batata doce, biri, mandioca, e taioba e propriedades de expansão após modificação fotoquímica. *Brazilian Journal of Food Technology*, 7, 129-137.

- LEONEL, M.; FERRARI, T.B.; SARMENTO, S.B.S.; OLIVEIRA, M.A. (2005). Planting time, developmental stages and characteristics of roots and starch of *Pachyrhizus ahipa*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 62(6), 528-533.
- LI, J. H.; VASANTHAN, T.; ROSSNAGEL, B.; HOOVER, R. (2001). Starch from hull-less barley: II. Thermal, rheological and acid hydrolysis characteristics. *Food Chemistry*, 74, 407-415.
- LIM, J.W.; MUN, S.H.; SHIN, M. (2004). Action of  $\alpha$ -amilase and acid on resistant starches prepared from normal maize starch. *Food Science and Biotechnology*, 14, 32-38.
- LIMBERGER, V.M.; SILVA, L.P.; EMANUELLI, T.; COMARELA, C.G.; PATIAS, L.D.. (2008). Modificação Química e Física do Amido de Quirera de Arroz para Aproveitamento na Indústria de Alimentos. *Química Nova*, 31, 84-88.
- LOMAURO, C.J.; BAKSHI, A.S.; LABUZA, T.P. (1985). Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 18(2), 111-117.
- LUNARDINI, A.C. (2008). Como melhorar a textura, o sabor e performance de produtos de panificação (2005). *ABAM*, 3, 11. Disponível em: <http://www.abam.com.br/revista/revista11/textura.php>. Acesso em: 30/08/2008.
- MAN, C.M.D., JONES, A.A. (1994). Shelf life evaluation of foods. Londres: Blackie Academic & Professional. 654p.
- MANNERS, D.J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, Essex, v.11, p.87-112, 1989.
- MARCON, M.J.A.; AVANCINI, S.R.P.; AMANTE, E.R. (2007). Propriedades Químicas e Tecnológicas do Amido de Mandioca e do Polvilho Azedo. Florianópolis: UFSC, 101p.
- MATHLOUTHI, M.; ROGÉ, B. (2003). Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. *Food Chemistry*, 82, 61-71.
- MAZURS, E.G.; SCHOCH, T.J.; KITE, F.E. (1959). Graphical analysis of the Brabender viscosity curves of various starches. *Cereal Chemistry*, 34, 3, 141-152.
- MAZZA, G.; LEMAGUER, M. (1980). Dehydration of onion: some theoretical and practical considerations. *Journal of Food Technology*, 15, 181-194.
- MCLAUGHLIN, C.P.; MAGGE, T.R.A. The determination of sorption isotherms and the isosteric heats of sorption for potatoes. *Journal of Food Engineering*, 35, 267-280, 1998.

MCMINN, W.A.M.; MAGEE, T.R.A. (2003). Thermodynamic properties of moisture sorption of potato. *Journal of Food Engineering*, 60, 157-165.

MESTRES, C. (1996). Los estados físicos del almidón. In.: Conferencia Internacional del almidón. Quito. Anais...Quito, p.2.

MILLER, L. G. (1959). *Anal Chem.*, 31, 426.

MONTEIRO, S.C., CARPES, S.T., KALUFF, V.H., DYMINSKI, D.S., CÂNDIDO, L.B.. (2006).Evolução dos substitutos de gordura utilizados na tecnologia de alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa e processamento de Alimentos (CEPPA)*4, 2, 347-362.

MOORE, G.R.P. (2001) Amido de milho e mandioca na produção de maltodextrinas. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina.

MOORTHY, S.N. (2004). Tropical sources of starch. *Starch in Foods*. New York: CRC Press, 321-359.

MORIKAWA, K.; NISHINARI, K. (2000). Effects of concentration dependence of retrogradation behaviour of dispersions for native and chemically modified potato starch. *Food Hydrocolloids*, 14, 395–401.

MORRISON, W.R. (1995). Starch lipids and how relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Food World*. 40, 437-445.

MUHN, A.H., BLANSHARD, J.M.V., BATES, D.R.. The effect of lintnerization on wheat and potato starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 4, 399-425.

MUN, S.; SHIN, M. (2006). Mild hydrolysis of resistant starch from maize. *Food Chemistry*, 96, 115-121.

National Starch and Chemical Corporation. LENCHIN, J.M., TRUBIANO, P.C., HOFFMAN, S. (1985). Converted starches for use as a fat or oil replacement in foodstuffs.

National Starch and Chemical Industrial Ltda (1995) – Divisão de Amidos Alimentícios. *Tecnologia de amido alimentício*. 13p.

NEWPORT SCIENTIFIC. Instruction Manual for the Series 4 Rapid Visco Analyzer. Newport Scientific Pty. Ltd., Australia, 1998.

O mercado diet e light. (2008). In.: Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para fins Especiais (ABIAD). Disponível em : <http://www.abiad.org.br..> Acesso em 15/08/2008.

OLIVAREZ, S.A.; NOREÑA, C.P.Z (2006). Estudo da secagem das sementes de pinhão a diferentes temperaturas de ar. X Congresso Argentino de Ciencia y Tecnologia de Alimentos, Mar del Plata, Argentina. Ed: Ciencia Actual, Buenos Aires.

ORDOÑEZ, J.A., CAMBERO, M.I.R., FERNÁNDEZ, L.A., GARCÍA SANZ, M.L., GARCÍA DE FERNANDO, G.D., HOZ PERALES, L., SELGAS CORTECER, M.D.(2005). Tecnologia de Alimentos, volume 1: Componentes dos Alimentos e Processos. Porto Alegre: Artmed.

PALIPANE,K.B.; DRISCOLL,R.H. (1992). Moisture sorption characteristics of inshell macadamia nuts. *Journal of Food Engineering*, 18, 63-76.

PENG,G.; CHEN,X.; WU,W.; JIANG,X. (2007). Modeling of water sorption isotherm for corn starch. *Journal of Food Engineering*,80,562-567.

PEREIRA,J.; SILVA, L.V.; CRUZ,R.(1999). Caracterização Química e Física do Amido de Batata-Baroa (arracacia xanthorrhiza, Bancroft). *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*.1135-1137.

PETRI, H.M. (2000). Reologia ajuda a determinar as propriedades dos alimentos. *Engenharia de Alimentos*, 30, 32 -38.

PITONDO, P.B.( 2001). Indústria busca substitutos para a gordura. *Óleos e Grãos: Alimentos e Tecnologia*.n.88, p.10-15, anoXII.

RADLEY, J.A. (1976) .Industrial uses of starch and its derivates. London: Applied Science Publishers Ltda, 276.

RAO, V.G.; PFOST, H.B. (1978). *Physical properties related to drying 20 grains*. ASAE paper no. 78. St. Joseph, Michigan: American Society of Agricultural Engineers. 3539.

RIBEIRO, P.A.M. (2000). Os mais antigos caçadores-coletores do sul do Brasil. In: Tenório, M.C. (Org.). *Pré-história da Terra Brasilis*. Editora UFRGS. 380p.

RICKARD, J.E.;ASAOKA,M.;BLANSHARD,J.M.V..(1991). The physicochemical properties of cassava starch. *Tropical Science*. 31, 189-207.

RICHTER,M.;SCHIERBAUM,S.A.; KLAUS-DIETER,K.. (1973). Method of producing starch hydrolysis products for use as a food additives. Akademie der Wissenschaften Der DDR.

ROBIN,J.P.; GELROTH,J.A.;GLASER,B.K. (1975). Lintnerized starches. Chromatographic and enzymatic studies of insoluble residues from acid hydrolysis of various cereal starches, particularly waxy maize starch. *Starch*, 27, 36-45.

ROSENTHAL, F.R.T.; NAKAMURA, T.; SPÍNDOLA, A.M.C.; JOCHIMEK, M.R. (1974). Structure of starch granules. Part 3. Some considerations of leguminosae and tuberosae. *Starch*, 26, 50-56.

SALGADO, S.M., GUERRA, N.B., ANDRADE, S. A. C., LIVERA, A.V.S.. (2005). Caracterização Físico-Química do Grânulo do Amido de Feijão Caupi. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 25(3), 525-530.

SANDHU, K.S.; SINGH, N.; LIM, S.T. (2007). A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 40, 1527-1536.

SATIN, M. (2000). Functional Properties of Starches. *Journal of Food Science*. 32, 178-185.

SCHRAMM, G. (1980). Introduction to rheology and rheometry. Alemanha: Gebruder, 567.

SETSER, C.S.; RACETTE, W.L.. (1992). Macromolecule replacers in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 275-297.

SHIRAI, M.A., HAAS, A., FERREIRA, G.F., MATSUGUMA, L.S., FRANCO, C.M.L., DEMIATE, I.M. (2007). Características físico-químicas e utilização em alimentos de amidos modificados por tratamento oxidativo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27 (2), 239-247.

SHIVHARE, U.S.; ARORA, S.; AHMED, J.; RAGHAVAN, G.S.V. Moisture adsorption isotherms for mushroom. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37. 133-137.

SHUJUN, W., JINGLIN, Y., JIUGAO, Y., HAIXIA, C.; JIPING, P. (2007) The effect of acid hydrolysis on morphological and crystalline properties of Rhizoma Dioscorea starch. *Food Hydrocolloids*, 21, 1217-1222.

SILVA, G.O., TAKIZAWA, F.F., PEDROSO, R.A., FRANCO, C.M.L., LEONEL, M., SARMENTO, S.B.S., DEMIATE, I.M. (2006). Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 188-197.

SILVA, R.M., FERREIRA, G.F., SHIRAI, M.A., HAAS, A., SCHERER, M.L., FRANCO, C.M.L., DEMIATE, I.M. (2008). Características físico-químicas de amidos modificados com permanganato de potássio/ácido láctico e hipoclorito de sódio/ácido láctico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 66-77.

SINGH, V.; ALI, S.Z. (2000) Acid degradation of starch. The effect of acid and starch type. *Carbohydrate Polymers*. 41, 191-195.

SIVIERI,K.; OLIVEIRA, M.N.( 2002). Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com “ Fat Replacers” (Litesse e Dairy-Lo). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22. 24-31.

SLESINSKI,M.J.; SUBAR,A.F.; KAHLE,L.L. (1995). Trends in use of vitamin and mineral supplements in the United States: the 1987 and 1992 National Health Interview Surveys. *Journal of American Dietetic Association*,95. 921-923.

SMITH,A.N.; DENYER,K.;MARTIN,C.( 1997). The synthesis of starch granule. *Plant Physiology*, 48.47-67.

SOARES,R.M.D. (2003). Caracterização parcial de amido em cultivares brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare* L.) Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

SPIESS, W.E.L.; WOLF, W.F (1983). The results of the COST 90 project on water activity. In R. Jowitt (Ed.), *Physical properties of foods*, *Applied Science Publishers*, 65-91.

STAHL, J.A.; LOBATO L.P.; BOCHI, V.C.; KUBOTA, E.H., GUTKOSKI, L.C.; EMANUELLI,T.(2007). Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia* Bert, O. Ktze) starch phosphates. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 40.1206-1214.

STENEL, J. (2004). Modelling the water sorption isotherms of yoghurt powder spray. *Mathematics and Computers in Simulation*, 65, 157-164.

TAKIZAWA,F.F.; SILVA,G.O.; KONKEL,F.E.; DEMIATE,I.M. (2004). Characterization os tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 921-931.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. Effect of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chemistry*, 67, 551–557.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. *Practical Guide for Food Industry. Starches*. Minnesota: Eagan Press, 1999. 30 p.

THYS, R.C.S.;Harry,W.; NoreñaC.P.Z.; Marczak,L.D.F.; Silveira,N.P.; Cardoso,M.B. (2008). Effect of the Alkaline Treatment on the Ultrastructure of C-Type Starch Granules, *Biomacromolecules* 9, 1894–1901.

TIMMERMAMNN,E.O.; CHIRIFE,J.; IGLESIAS,H.A. (2001). Water sorption isotherms of food and foodstufs:BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering*, 48, 19-31.



TOLABA, M.P.; PELTZER, M.; ENRIQUEZ, N.; POLLIO, M.L. (2004). Grain sorption equilibria of quinoa grains. *Journal of Food Engineering*, 61. 365-371.

TORRINGA, E.; ESVELD, E.; SCHEEWE, I.; VAN DEN BERG, R. BARTELS, P. (2001). Osmotic dehydration as a pré-treatment before combined microwave-hot-air drying of mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 49. 184-191.

TSAMI, E. (1991). Differential enthalpy of sorption in dried fruits. *Journal of Food Engineering*, 14, 327-335.

VAN DEN BERG,C.; KAPER,F.S.; WELDRING,J.A.G.; WOLTERS,I. (1975). Water binding by potato starch. *Journal of Food Technology*, 10,589-602.

VANDERVEEN, J.E.; GLINSMANN, W.H. (1992). Fat substitutes: a regulatory perspective. *Annu.Rev. Nutr.*, California, 12.473-487.

VIEIRA, F. C. Efeito do tratamento com calor e baixa umidade sobre características físicas e funcionais dos amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), de batata-doce (*Ipomoea batatas*) e de gengibre (*Zingiber officinale*). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, 1994. 94 p.

VISWANATHAN, R.; JAYAS, D.S.; HULASARE, R.B. (2003). Sorption isotherms of tomato slices and onion shreds. *Biosystems Engineering*, 86. 465-472.

WALISZEWSKI, K.N.; APARICIO, M.A.; BELLO, L.A.; MONROY,J.A. (2003) Changes of banana by chemical and physical modification. *Carbohydrate Polymers*, 52, 237-242.

WALISZEWSKI,K.N.; APARICIO,M.A.; BELLO,L.A.; MONROY,J.A. (2003). Changes of banana starch by chemical and physical modification. *Carbohydrate Polymers*. 52, 237-242.

WANG, Y.J.; WANG, L. (2003). Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*, 52, 207–217.

WELTI-CHANES, J.; VERGARA, B.F. (1997). Actividad de agua. Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. In J.M. Aguilera (Ed.) *Temas en Tecnología de Alimentos*. México.

WESTGATE,P.; LEE,J.Y.;LADISCH,M.R. (1992). Modeling of equilibrium sorption of wáter vapour on starch materials. *American Society of Agricultural Engineers*, 35, 213-219.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. Starch. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Saint Paul: AACC, Eagan Press, 1997. p. 117-151.

WHISTLER, R.L.; PASCHALL, E.F.(1965) Starch: chemistry and technology. New York and London: Academic Press, 1,579.

WHITE,P.J.; ABBAS, I.R.; JOHNSON, L.A. (1989). Freeze-thaw stability and refrigerated-storage retrogradation of starches. *Starch*, 41,176-181.

WILLIAMS, P.C.; KUZINA, F.D.; HLYNKA, I. (1970). A rapid calorimetric procedure for estimating the amylase content of starchs and flours. *Cereal Chemistry*, 47, 411-420.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. (1984).Characterization of pinhao starch. Part I: - Extraction and properties of pinhao starch. *Starch/Stärke*, 37, 224-227.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Characterization of pinhao starch (1989).Part III: hydration of the granules and susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Starch/Stärke*, 41, 327-330.

WURZBURG,O.B.( 1986). *Modified Starches: proprieties and uses*. Boca Raton: CRC Press. 277.

YANG, Y.; XU,S. (2007). Roles os components of rice-based fat substitute in gelation. *Food Research International*. 40, 1155-1160.

YOU,S.; IZYDORCZYK,M.S. (2007). Comparison of the physicochemical properties of barley starches after  $\alpha$ -amylolysis and acid/alcohol hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 69,489-502.

YUAN,Y.; ZHANG,L.; DAI, Y.; YU,J.(2007). Physicochemical properties of starch obtained from Dioscorea nipponica Makino comparison with other tuber starches. *Journal of Food Engineering*, 82 436–442

YOUNG,J.F. (1976). Humidity control in the laboratory using salt solutions – a review. *Journal of Applied Chemistry*, 17, 241-245.

ZAMBRANO, F.; CAMARGO, C.R.O.(1998). Avaliação do amido de pinhão como substituto de gordura (Tese de Doutorado).

ZAMBRANO, F.; CAMARGO, C.R.O.(1999). Substitutos de gordura derivados de amido utilizados em panificação. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33.235-244.

ZAMBRANO, F.; CAMARGO, C.R.O.(2001a). Otimização das Condições de Hidrólise Ácida de Amido de mandioca para obtenção de substitutos de gordura. *Brazilian Journal of Food Technology*, 4,147-154.

ZAMBRANO, F.; CAMARGO, C.R.O.(2001b). Amido de Mandioca Modificado Comparado com Substitutos de Gordura Comerciais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 4,155-161.

ZANDAVALLI, R.B.; DILLENBURG, L.R.; DE SOUZA, P.V.D. (2004). Growth response of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Applied Soil Ecology*, 24, 245-255.

ZHANG, P.; WHISTLER, R. L. ; BEMILLER, J. N. ; HAMAKER, B. R.(2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility- a review. *Carbohydrate Polymers*, 59. 443– 458.

ZHANG,G.; AO,Z.; HAMAKER,B.R.(2006). *Biomacromolecules*.7. 3252-3258.

ZOBEL, H.F. (1988). Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Starke*, 40. 44-50.

ZOBEL, H.F.;STEPHEN,A.M..(1995). Starch: structure, analysis and application. In: Stephen,A.M. Food polysaccharides and their application. New York: Marcel Dekker. 19-66.

## 8 ANEXOS

### 8.1 ANEXO 1: CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO VALOR DE DEXTROSE EQUIVALENTE (DE)

