

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE NANOAMIDO DE PINHÃO ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ÁCIDA E
ULTRASSOM PARA INCORPORAÇÃO DA NISINA**

Paula Migowski Gonçalves

Porto Alegre

2013

Paula Migowski Gonçalves

**OBTENÇÃO DE NANOAMIDO DE PINHÃO ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ÁCIDA E
ULTRASSOM PARA INCORPORAÇÃO DA NISINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli
Co-orientador: Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata
Noreña

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Gonçalves, Paula Migowski
OBTENÇÃO DE NANOAMIDO DE PINHÃO ATRAVÉS DE
HIDRÓLISE ÁCIDA E ULTRASSOM PARA INCORPORAÇÃO DA
NISINA / Paula Migowski Gonçalves. -- 2013.
103 f.

Orientador: Adriano Brandelli.
Coorientador: Caciano Pelayo Zapata Noreña.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. amido. 2. pinhão. 3. nanoamido. 4. nisina. I.
Brandelli, Adriano, orient. II. Noreña, Caciano
Pelayo Zapata, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM C&T DE ALIMENTOS/PPGCTA

Autor: Paula Migowski Gonçalves

Título da dissertação: Obtenção de nanoamidos de pinhão através de hidrólise ácida e ultrassom para incorporação de nisina

Dissertação aprovada por:

Prof.Dr. Plinho Francisco Hertz
Membro da Comissão Julgadora

Prof.Dr Ricardo Vinicius Bof de Oliveira
Membro da Comissão Julgadora

Prof.^a Dr.^a Roberta Cruz Silveira Thys
Membro da Comissão Julgadora

Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub
Coordenador do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do ICTA/ UFRGS

Porto Alegre, 11 de março de 2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Brandelli, pelos ensinamentos e pela confiança.

Às gurias do laboratório 218: Ana, Ju, Indy, Roberta e Stela. Certamente o mestrado foi muito melhor graças a vocês. Obrigada pelo apoio, amizade, conversas e ensinamentos.

Às gurias do laboratório 116. Valeu a força e o empréstimo de equipamentos.

A minha mãe, que sempre foi minha maior incentivadora, minha melhor amiga, minha confidente e meu porto seguro. Brigada por todo amor, confiança e conselhos! Te amo!

A minha querida vó Amarilis, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado. É um exemplo de vida a ser seguido.

Ao meu irmão que juntamente com a minha mãe e minha vó são a base de tudo.

Ao meu tio Sérgio e sua família por todo apoio, amor e incentivo.

Aos meus três anjinhos: Léo, Dudu e Nicole.

Ao Gustavo, meu namorado, por todo amor, paciência, carinho e compreensão durante todo esse tempo.

Ao Godines, meu fiel companheiro.

As minhas amigas e amigos pela parceria. Em especial a Aninha, Paula, Leti, Fe, Aline e Ana.

Aos funcionários do ICTA.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Amido nativo (AN) extraído das sementes de pinhão foi modificado por duas metodologias: hidrólise ácida (AHA) e ultrassom (AUS). As três amostras – AN, AHA e AUS - foram submetidas à secagem em *spray dryer*. Efetuaram-se análises de composição centesimal, características reológicas e morfologia por microscopia eletrônica de varredura. As moléculas de amido modificado por ondas ultrassônicas e por hidrólise ácida atingiram tamanho nanométrico, representando redução de aproximadamente 97% e 99,85%, respectivamente. As três amostras foram significativamente diferentes em relação ao teor de amido e amilose, ao percentual de sinérese e a colorimetria. A amostra AHA diferiu das demais em termos de solubilidade (mais solúvel), higroscopicidade (mais higroscópica) e claridade de pasta (mais translúcida). As amostras AN e AUS tiveram suas cargas aparentes modificadas com adição de anidrido succínico para a incorporação de nisina através da atração eletrostática. Alíquotas dessas amostras foram dispostas em placas com ágar BHI previamente inoculadas com *Listeria monocytogenes*. Estas foram mantidas em diferentes temperaturas, 4 e 37°C. A avaliação da atividade antimicrobiana foi medida através do halo de inibição. As placas armazenadas a temperatura mais baixa apresentaram maior atividade no decorrer dos 21 dias quando comparadas as mantidas a 37°C. Neste estudo pode-se observar que as modificações realizadas nas moléculas de amido pinhão atingiram escala nanométrica e que a incorporação de nisina na superfície destas foi eficaz, resultando na inibição da *L. monocytogenes* através da formação de halos de inibição.

Palavras-chave: amido, pinhão, nanoamido, nisina

ABSTRACT

Native starch (AN) extracted from the seeds of pinhão was modified by two methods: acid hydrolysis (AHA) and ultrasound (AUS). The three samples - AN, AHA and AUS - were subjected to spray drying. We carried out analyzes of chemical composition, rheological characteristics and morphology by scanning electron microscopy. The modified starch molecules by ultrasonic waves and by acid hydrolysis achieved nanosize, representing a reduction of approximately 97% and 99.85% respectively. The three samples were significantly different in four items: starch and amylose content, the percentage of syneresis and colorimetry. The AHA sample differed from the others in terms of solubility (more soluble), hygroscopicity (more hygroscopic) and paste clarity (more translucent). The samples of AN and AUS had their apparent charge modified with addition of succinic anhydride to incorporation of microspheres of nisin by electrostatic attraction. Aliquots of these samples were placed in Petri dishes containing BHI agar inoculated with *Listeria monocytogenes*. These were kept at different temperatures, 4 and 37 ° C. The antimicrobial activity was measured by the inhibition zone. The plates stored at lower temperature showed greater activity during the 21 days when compared with those maintained at 37 ° C. In this study it can be seen that the nanomolecules with microspheres nisin showed antimicrobial activity lower than the molecules of pinhão native starch microspheres nisin, suggesting that they have low stability.

Keywords: starch, pinhão, nanostarch, nisin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas da amilose e amilopectina, respectivamente.....	20
Figura 2 - Vista superior do empacotamento cristalino de hélices duplas dos tipos A e B (células unitárias).....	21
Figura 3 - Amido ácido modificado.....	35
Figura 4 - Atomizador LABMAQ LM 1.0.....	44
Figura 5 - Diagrama de cromaticidade parâmetros a^* e b^* . AN, amido nativo; HA, amido modificado por hidrólise ácida; US, amido modificado por ultrassom.....	62
Figura 6 - Micrografias dos grânulos de amido nativo de pinhão obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1000x (A) e 4500x (B).....	70
Figura 7 - Micrografias dos grânulos de amido de pinhão submetidos à hidrólise ácida obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1000x (A) e 5000x (B).....	70
Figura 8 - Micrografias dos grânulos de amido de pinhão submetidos ondas ultrassônicas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1000x (A) e 5000x (B).....	71
Figura 9 – Gráfico de distribuição granulométrica do amido nativo de pinhão.....	71
Figura 10 - Diagrama de difração de raio-X do amido nativo de pinhão e amidos modificados.....	73
Figura 11 - Micrografias das moléculas de amido nativo adicionadas de anidrido succínico (figura 11A) e das moléculas de nanoamido sonicado adicionado de anidrido succínico (figura 11B) obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 4500x.....	75
Figura 12 - Amido nativo filtrado (Figura 12A) e nanoamido sonicado (Figura 12B) em placas de ágar BHI inoculadas com <i>L. monocytogenes</i>	77
Figura 13 - Micrografias das moléculas de amido nativo com microesferas de nisina obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1500x (Figura 13A) e 4500x (Figura 13B).....	78
Figura 14 - Halos de inibição do amido nativo de pinhão com nisina incorporada apresentados no 3º dia de armazenamento em placas com ágar BHI previamente inoculadas com <i>L. monocytogenes</i>	81
Figura 15 - Halos de inibição do nanoamido sonicado com nisina incorporada apresentados no 3º dia de armazenamento em placas com ágar BHI previamente inoculadas com <i>L. monocytogenes</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas realizadas com o pinhão cru e cozido.....	18
Tabela 2. Vantagens e desvantagens do uso da técnica de spray drying.....	31
Tabela 3. Tipos de modificação da molécula de amido e técnicas de preparação	33
Tabela 4. Umidade e atividade de água das amostras de amido de pinhão nativo e modificado.....	56
Tabela 5. Teor de lipídeos e proteína das amostras de amido de pinhão nativo e modificado.....	57
Tabela 6. Teor de amido e amilose nas amostras de amido de pinhão nativo e modificado.....	58
Tabela 7. Teor de Fibra Bruta nas amostras de amido de pinhão nativo e modificado.....	60
Tabela 8. Teor de cinzas nas amostras de amido de pinhão nativo e modificado	61
Tabela 9. Análise Colorimétrica das amostras de amido de pinhão nativo e modificado.....	62
Tabela 10. Solubilidade média das amostras.....	63
Tabela 11. Sinérese média das amostras das amostras de pinhão nativo de amido modificado	65
Tabela 12. Higroscopicidade das amostras de amido de pinhão nativo de amido modificado	67
Tabela 13. Claridade da pasta das amostras de amido de pinhão nativo e amido modificado.....	68
Tabela 14. Diâmetro médio das amostras de amido de pinhão submetido ao tratamento de ondas ultrassônicas (US) e ao tratamento de hidrólise ácida (HA)	73
Tabela 15. Potencial Zeta das amostras.....	75
Tabela 16. Potencial Zeta das amostras de amido nativo e nanoamido sonicado adicionados de anidrido succínico e nisina.	78
Tabela 17. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas.	79
Tabela 18. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas.	80
Tabela 19. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.	80
Tabela 20. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.	81
Tabela 21. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas	82

Tabela 22. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas.....	83
Tabela 23. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.....	83
Tabela 24. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.....	84

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 PINHÃO.....	17
3.2 AMIDO	18
3.2.1 GELATINIZAÇÃO.....	22
3.2.2 RETROGRADAÇÃO	23
3.2.3 SOLUBILIDADE	23
3.2.4 SINÉRESE.....	24
3.2.5 HIGROSCOPICIDADE	25
3.2.6 CLARIDADE DA PASTA	26
3.2.7 COLORIMETRIA.....	27
3.2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	27
3.2.9 ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS).....	28
3.2.10 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX).....	29
3.2.11 SPRAY DRYING	29
3.3 AMIDOS MODIFICADOS.....	31
3.3.1 HIDRÓLISE ÁCIDA	35
3.3.2 ULTRASSOM	36
3.4 APLICAÇÕES DO AMIDO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	38
3.5 NANOAMIDOS.....	40
3.6 APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS EM ALIMENTOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES.....	43

4.1.1 EXTRAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO	43
4.1.2 TRATAMENTO DO AMIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA	44
4.1.3 TRATAMENTO DO AMIDO POR ULTRASSOM	45
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	45
4.2.1 UMIDADE	45
4.2.2 ATIVIDADE DE ÁGUA	46
4.2.3 TEOR DE FIBRA BRUTA	46
4.2.4 TEOR DE CINZAS	46
4.2.5 TEOR DE LIPÍDEO	46
4.2.6 TEOR DE PROTEÍNA	46
4.2.7 TEOR DE AMIDO	47
4.2.8 TEOR DE AMILOSE	47
4.2.9 TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	47
4.2.10 COLORIMETRIA	48
4.3 SOLUBILIDADE	48
4.4 SINÉRESE	48
4.5 HIGROSCOPICIDADE	49
4.6 CLARIDADE DA PASTA	49
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	49
4.8 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA	50
4.9 ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS)	50
4.10 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)	51
4.11 INCORPORAÇÃO DE NISINA AO AMIDO DE PINHÃO	51
4.11.1 MODIFICAÇÃO DA CARGA DO AMIDO DE PINHÃO NATIVO E DO NANOAMIDO DE PINHÃO SONICADO	51
4.11.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NISINA	51
4.11.3 ADIÇÃO DA NISINA ÀS PARTÍCULAS	52
4.11.4 POTENCIAL ZETA	52
4.11.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	52
4.11.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E MODIFICAÇÃO DO AMIDO	55
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	56
5.3 SOLUBILIDADE	63

5.4 SINÉRESE.....	65
5.5 HIGROSCOPICIDADE	67
5.6 CLARIDADE DA PASTA	68
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	69
5.8 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA	72
5.9 ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS)	73
5.10 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)	73
5.11 INCORPORAÇÃO DE NISINA NO AMIDO DE PINHÃO	75
5.11.1 MODIFICAÇÃO DA CARGA.....	75
5.11.2 ADIÇÃO DA NISINA ÀS PARTÍCULAS DE AMIDO	76
5.11.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	79
6. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* pertence à família Araucariaceae e é a única espécie conífera nativa brasileira de importância econômica (ZANDAVALLI *et al.*, 2004). É uma árvore amplamente distribuída em florestas nativas no sul do Brasil, no Paraguai, na Argentina e no Chile, na qual o pinhão é a semente produzida (WOSIACKI; CEREDA, 1984; CORDENUNSI *et al.*, 2004).

Até algum tempo atrás, esta espécie possuía elevada importância comercial. Porém, devido a sua extração irracional, por motivos comerciais, ou de 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. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) tornou pública, através da Portaria Nº 37-N, de 3 de abril de 1.992, a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção, dentre as quais consta a *Araucaria Angustifolia*, conhecida como Pinheiro do Paraná, presente na categoria vulnerável (IBAMA, 2012). Por isso, pesquisas relacionadas ao uso sustentável dos derivados da Araucária, como o pinhão, poderiam estimular a preservação da espécie (WOSIACKI; CEREDA, 1984). Atualmente, sua área remanescente está reduzida para cerca de 1% comparativamente aos 200.000 Km² de área original estimada (EMBRAPA, 2001).

Segundo Santos *et al.* (2002), para que o consumo e a produção de pinhão se desenvolva, estendendo este hábito alimentar para outras regiões e países, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre técnicas de conservação e industrialização, disponibilizando-o ao consumidor nas demais estações do ano, uma vez que sua safra restringe-se aos meses de maio a setembro.

O pinhão possui em sua composição centesimal aproximadamente 36% de amido (CORDENUNSI *et al.*, 2004), que é um biopolímero versátil de baixo custo que tem sido amplamente usado na indústria de alimentos e em muitas aplicações industriais (JOBILING, 2004; SONG *et al.*, 2009), atuando como estabilizantes e proporcionando 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, pães, e outros (ZAMBRANO; CAMARGO, 1999). Além disso, é um dos materiais mais utilizados para encapsulação, graças a sua

capacidade de se ligar a compostos de sabor, a sua diversidade e baixo custo (DZIEZAK, 1988).

Entretanto, frequentemente os amidos nativos ou naturais não são os mais adequados para processamentos específicos. As modificações do amido nativo são feitas para proporcionar produtos amiláceos com as propriedades necessárias para usos específicos. As várias formas de se conseguir modificar os amidos nativos são alterar uma ou mais das seguintes propriedades: temperatura de pasta, relação sólidos/viscosidade, resistência das pastas de amido à quebra de viscosidade por ácidos, calor e/ou agitação mecânica (cisalhamento), tendência de retrogradação, caráter iônico e hidrofílico (SWINKELS, 1996).

Nos últimos anos, a preparação e a aplicação de nanocristais/nanopartículas biodegradáveis tem atraído muito interesse na área de pesquisas e o amido, por ser um polímero natural biodegradável, é um bom candidato para a formação de nanocristais/nanopartículas (SONG; THIO; DENG, 2011). Recentemente, Le Corre, Bras e Dufresne (2010), publicaram uma revisão sobre a preparação, caracterização e aplicações de nanopartículas de amido, as quais têm muitas aplicações potenciais, como aditivos alimentares, compostos biodegradáveis, adesivos, entre outros.

Aliado a esses desenvolvimentos, verifica-se a crescente preocupação da população em consumir produtos naturais, sem adição de conservantes químicos, fazendo com que os agentes antimicrobianos naturais sejam uma alternativa atrativa para oferecer produtos saudáveis e seguros (AGENTES ..., 2010).

A nisina é uma bacteriocina naturalmente produzida em vários alimentos fermentados, especialmente produtos lácteos (CLEVELAND et al., 2001). Porém, um dos problemas na aplicação direta das bacteriocinas nos produtos alimentícios é a diminuição ou perda da atividade antimicrobiana, devido a interações da bacteriocina com os componentes do alimento (JUNG et al., 1992; BRANEN; DAVISON, 2004; CHOLLET et al., 2008). Para proteger as bacteriocinas dessas interações indesejáveis pode-se fazer a encapsulação destas em lipossomas (JESORKA; ORWAR, 2008), ou nanopartículas de polissacarídeos e proteínas (BI et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o amido extraído do pinhão e os nanoamidos, que foram modificados por hidrólise ácida e ultrassom, visando comparar as propriedades do amido nativo e modificados. À superfície dos nanoamidos obtidos pela aplicação de ondas ultrassônicas e do amido nativo extraído do pinhão incorporar nisina para avaliar atividade antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extrair o amido das sementes de pinhão e modificar sua estrutura através do uso de duas metodologias: hidrólise ácida e ultrassom.
- b) Submeter as preparações de amido nativo e modificado ao processo de secagem em atomizador;
- c) Caracterizar os amidos nativo e modificados quanto ao tamanho de partícula, sinérese, solubilidade em água, higroscopicidade, cristalinidade, morfologia dos grânulos, umidade, atividade de água;
- d) Modificar a carga aparente das moléculas de amido nativo e modificado (utilizando-se anidrido succínico);
- e) Incorporar nisina às moléculas de amido modificado com anidrido succínico através da atração eletrostática do amido com a nisina, a qual é carregada positivamente;
- f) Medir a atividade antimicrobiana através do tamanho do halo da nisina livre, do amido nativo (retido e filtrado) e do amido submetido à ultrassom (retido e filtrado), em placas BHI com *Listeria monocytogenes*, quando armazenados em estufa a 37°C e em geladeira a aproximadamente 4°C.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PINHÃO

A *Araucaria angustifolia*, espécie encontrada na América do Sul, está inserida no domínio da Mata Atlântica e nomeada Floresta Ombrófila Mista pelo encontro das floras Temperadas Austro-brasileira e Tropical Afro-brasileira, sendo também conhecida como floresta de pinheiros, pinhais ou mata de araucária. Sua semente, conhecida como pinhão, apresenta casca de cor marrom avermelhada. A polpa, parte comestível e muito dura quando crua, necessita de processo de abrandamento de sua textura para permitir o consumo. Seu desenvolvimento ocorre em locais de grandes altitudes, entre 500 e 1500 m, com temperatura anual média entre 11,5 e 21°C (KOCH; CORRÊA, 2002).

O pinhão é consumido após o cozimento e posterior descascagem ou utilizado como farinha em pratos regionais. As sementes podem ser consideradas como fonte de amido, fibra dietética, magnésio e cobre, possuindo baixos conteúdos de proteína, lipídios, açúcares solúveis e compostos 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.

Segundo Cladera-Olivera (2008), a estabilidade do pinhão foi avaliada sob diferentes temperaturas de armazenamento: a 25°C (temperatura ambiente) foi de 5 dias; a 5°C (temperatura de refrigeração), de 3 meses e a -18°C (temperatura de congelamento) por 8 meses, no mínimo. A vida de prateleira das sementes foi afetada, principalmente pela alta umidade e atividade de água que o pinhão apresenta, propiciando o desenvolvimento de fungos e a germinação das sementes.

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas realizadas com o pinhão cru e cozido

Análise *	Pinhão cru	Pinhão cozido
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

*% base úmida

Fonte: Cordenunsi et al., (2004)

Os grânulos de amido do pinhão possuem variadas formas nas quais coexistem tanto grânulos ovais, quanto elipsóides truncados ou hemisféricos, apresentando superfície lisa. Lindeboom, Chang, Tyler (2004) classificaram os grânulos de amido de acordo com o seu tamanho, considerando grandes aqueles que apresentam diâmetro maior que 25µm, médios os que possuem valores entre 10 e 25µm, pequenos entre 5 e 10µm e bem pequenos os menores de 5µm. O diâmetro médio dos grânulos de amido de pinhão varia entre 7 e 20 µm. Sob luz polarizada, o grânulo de amido do pinhão apresenta birrefringência característica (Cruz de Malta) até a temperatura de aproximadamente 50,3°C (THYS, 2009).

De acordo com Bello-Pérez et al., (2006), a superfície dos grânulos de amido de pinhão é bastante lisa, sem apresentar irregularidades ou porosidade superficial. Tal característica é muito importante, pois a presença de canais e porosidades pode ter efeito na reatividade do amido modificado quimicamente, assim como em suas propriedades funcionais e físico-químicas.

3.2 AMIDO

As características químicas e físicas e os aspectos nutricionais do amido o destacam entre os demais carboidratos. Ele é uma reserva alimentar predominante das plantas, fornecendo 70-80% das calorias de consumo humano no mundo. O amido distingue-se entre

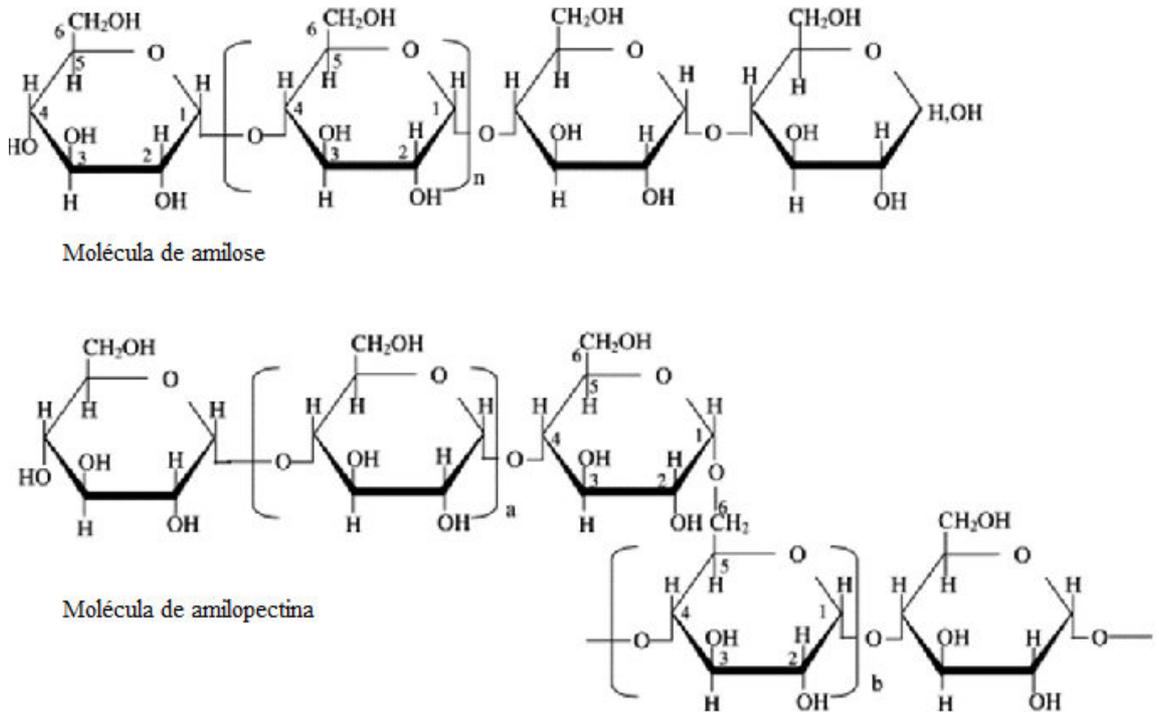
os carboidratos por ocorrer, na natureza, em partículas características denominadas grânulos. Os grânulos de amido são pouco solúveis, hidratando-se muito pouco em água fria. Desse modo eles podem ser dispersos na água, formando uma suspensão de baixa viscosidade que pode ser facilmente misturada e bombeada. A capacidade de aumento da viscosidade (espessante) do amido é obtida apenas quando a suspensão de grânulos é cozida. Aquecendo-se uma suspensão de 5% dos principais grânulos de amidos nativos a 80°C, sob agitação, obtém-se uma dispersão de alta viscosidade que pode ser chamada de goma (WURZBURG, 1986).

Os grânulos de amido são a mistura de basicamente dois componentes: a amilose e a amilopectina. Normalmente, nos grânulos de amido há de 20 a 30% de amilose e 70 a 80% de amilopectina, dependendo da fonte botânica. O tamanho e o formato dos grânulos de amido variam de acordo com a espécie da planta (ZOBEL, 1988). O amido, um polímero natural abundante, possui muitas propriedades, tais como biodegradabilidade e biocompatibilidade (JOBBLING, 2004; SONG, 2009).

A amilose (Figura 1) é uma cadeia essencialmente linear de unidade de α -D-glicopiranosil unidas por ligações (1→4) (PARIS et al., 1999). A posição axial→equatorial de acoplamento da unidade α -D-glicopiranosil confere à molécula forma helicoidal ou espiral, voltada para a direita. O interior da hélice contém predominância de átomos de hidrogênio e é hidrofóbico/lipofílico, enquanto no exterior da hélice estão posicionados os grupos hidroxila, sendo que cada volta da hélice contém cerca de seis unidades de α -D-glicopiranosil unidas por ligações (1→4) (WHISTLER; BEMILLER; PASCHALL, 1984).

A amilopectina (Figura 1) é uma macromolécula altamente ramificada com ligações (1→4)- α -D-glicopiranosil ligadas através das ligações α -(1→6) (PARIS et al., 1999). Os pontos de conexão das ramificações constituem entre 4 e 5% do total de ligações, sendo constituída de uma cadeia que contém apenas grupos redutores terminais, nos quais estão ligadas numerosas cadeias ramificadas (MANNERS, 1989).

Figura 1 - Estruturas químicas da amilose e amilopectina, respectivamente.



Fonte: TESTER et al. (2004) adaptado.

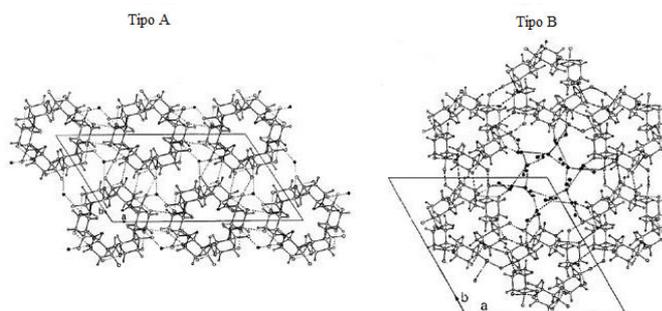
O modelo tradicional da estrutura interior dos grânulos de amido é composto de duas regiões – camadas cristalinas e amorfas, as quais juntas formam os anéis de crescimentos (JENKINS; COMERSON; DONALD, 1994). Os grânulos de amido nativo possuem estrutura interna anular, que alterna entre camadas cristalinas e semicristalinas (GIDLEY; BOCIEK, 1985). O componente predominante da região cristalina é a amilopectina, as quais se unem e formam estruturas de cristais de dupla hélice. O emparelhamento das duplas hélices forma interações de menor energia de ligação quando comparada com a interação das duplas hélices (IMBERTY et al., 1991). A região amorfa do grânulo, a qual contém predominantemente moléculas de amilose, é hidrolisada mais facilmente do que a região cristalina, pois as ligações $\alpha(1-4)$ são mais facilmente hidrolisadas (WANG; TRUONG; WANG, 2003).

Cada grânulo de amido possui um centro original de crescimento, denominado hilo, onde as camadas sucessivas de amido com diferentes graus de hidratação são depositadas na forma de amilose ou amilopectina, determinando se a camada é amorfa ou cristalina (FENNEMA, 2000).

A cristalinidade do grânulo de amido que gira em torno de 15 a 45% se deve basicamente à amilopectina 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 Mestre (1996) estes padrões têm as seguintes características (Figura 2):

- 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 como tipo C com características de A e B, mas predominantemente A. Este tipo compreende os amidos de ervilha e algumas variedades de feijão (ROSENTHAL, et al., 1974).

Figura 2 - Vista superior do empacotamento cristalino de hélices duplas dos tipos A e B (células unitárias).



Fonte: IMBERTY; PEREZ (1988).

Os grânulos de amido nativo são insolúveis em água fria, mas podem absorver água de modo reversível, ou seja, retornam ao seu estado original quando secos. O aquecimento do amido em excesso de água, promove intumescimento do grânulo e aumento de sua solubilidade. Esse poder de intumescimento e solubilidade provém da magnitude da interação entre as cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos. A extensão desta interação é influenciada pela razão amilose/amilopectina e pelas características da amilose e

amilopectina em termos de massa molares, distribuição, grau e comprimento da ramificação e conformação (SWINKELS, 1985).

3.2.1 GELATINIZAÇÃO

No processamento e armazenamento, as mudanças ocorridas na estrutura do amido influenciam profundamente as suas propriedades funcionais e fisiológicas (COLONNA; LELOUP; BULÉON, 1992).

Durante o aquecimento em meio aquoso, os grânulos de amido sofrem mudanças em sua estrutura, envolvendo a ruptura das pontes de hidrogênio estabilizadoras da estrutura cristalina interna do grânulo, quando a temperatura característica para cada tipo de amido é atingida. Se o aquecimento prossegue com quantidade suficiente de água, rompe-se a região cristalina e a água entra, fazendo o grânulo romper-se e perder a birrefringência, isto é, não se visualiza mais a cruz de Malta sob luz polarizada (GERMANI, 1999).

Os grânulos de amido intumescem até que a pressão osmótica gerada pelos grânulos (dependente diretamente da afinidade do solvente com o amido) se iguale à firmeza da rede de gel. Se as características forem alteradas, por exemplo, pelo aumento da temperatura, a aplicação de cisalhamento ou a adição de outros componentes com elevada afinidade com as cadeias de amido poderá ocorrer aumento ou redução do inchamento dos grânulos (PARKER; RING, 2001).

A gelatinização pode ser caracterizada por endoterma obtida através de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), pela perda de birrefringência, observada usando-se microscopia de luz polarizada (perda da cruz de malta) e pelo desaparecimento da cristalinidade evidenciada pela difração de raio X (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006).

O fenômeno seguinte à gelatinização denomina-se empastamento, envolve inchamento granular, separação dos componentes granulares moleculares e, eventualmente, total rompimento dos grânulos. Nesta etapa há aumento na viscosidade da solução, ocorrendo a formação da pasta, constituída de uma fase contínua de amilose solubilizada e/ou moléculas de amilopectina, e uma fase descontínua de grânulos remanescente (FENNEMA, 2000). 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 (MARCON et al., 2007).

3.2.2 RETROGRADAÇÃO

A gelatinização refere-se à formação de uma pasta visco-elástica túrbida ou, em concentrações suficientemente altas, de um gel elástico opaco. Conforme a temperatura diminui (na refrigeração ou congelamento, principalmente), as cadeias de amido tendem a interagir mais fortemente entre si, obrigando a água a sair e determinando, assim, a chamada sinérese. A recristalização ou retrogradação ocorre quando, após a solubilização durante o processo de gelatinização, as cadeias de amilose, mais rapidamente que as de amilopectina, agregam-se formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio. Durante o esfriamento e/ou envelhecimento, estas hélices formam estruturas cristalinas tridimensionais altamente estáveis, com padrão B de difração de Raios X (GERMANI, 1999).

O conteúdo de amilose é descrito como sendo um dos fatores que influencia a retrogradação do amido. Maior proporção de amilose tem sido tradicionalmente ligada como maior tendência a retrogradação nos amidos, mas a amilopectina, materiais intermediários, tamanho e forma dos grânulos e fonte botânica, também tem papel importante na retrogradação durante armazenamento refrigerado (SINGH et al., 2003).

Sob resfriamento, esta suspensão forma um gel elástico metaestável que durante o armazenamento sofre mudanças estruturais. Este processo é acompanhado por um aumento gradual na rigidez e separação de fases entre polímero e solvente, ou seja, ocorre a saída da água ligada às cadeias de amilose, fenômeno denominado sinérese (LOBO; SILVA, 2003).

Os polímeros da amilopectina retrogradada, limitados pela sua estrutura ramificada, são menos firmemente ligados que os da amilose retrogradada, conferindo a esta última maior resistência à hidrólise enzimática (COLONNA, LELOUP, BULÉON, 1992).

3.2.3 SOLUBILIDADE

Os grânulos de amido são relativamente insolúveis em água a temperatura ambiente. Quando submetidos ao aquecimento (em banho-maria, autoclave e microondas), tratamento a alta pressão, forças de cisalhamento e pH alcalino, estes grânulos apresentam aumento da solubilidade em água. Entretanto, esses mecanismos podem causar degradação molecular e, conseqüentemente, diminuir o peso molecular do amido (BELLO-PÉREZ et al., 1998; HAN; LIM, 2004; JACKSON, 1991; KIM; HUBER; HIGLEY, 2006; YOU; LIM, 2000).

O amido puro é tido como praticamente insolúvel e, quando adicionado à água fria e mantido sob agitação, forma uma suspensão de aspecto leitoso, a qual, mantida em repouso, resulta na precipitação de parte do amido (CEREDA; VILPOUX, 2003).

Os grânulos de amido podem absorver água de modo reversível, isto é, retornam ao seu estado original quando secos. Quando aquecidos em excesso de água resultam no intumescimento do grânulo e, conseqüentemente, no aumento da solubilidade. O poder de intumescimento e solubilidade resulta da magnitude da interação entre as cadeias de amido nas regiões amorfas e cristalinas, a qual é influenciada pela razão de amilose/amilopectina e a característica destas em razão de massa molar, distribuição, grau e comprimento da ramificação e conformação (SWINKELS, 1985).

De acordo com Leach et al. (1959), a solubilidade e o poder de inchamento apresentam-se correlacionados, pois há dois tipos de forças envolvidas nas interações das cadeias poliméricas que relaxam a diferentes temperaturas. As féculas de mandioca e de batata, por exemplo, apresentam grande inchamento a temperaturas mais baixas, o que indica interações mais fracas e uniformes. A presença de outras substâncias, como lipídios, pode restringir a expansão e a solubilização do amido (SWINKELS, 1985).

A determinação do poder de inchamento e solubilidade ocorre em temperatura elevada, promovendo a hidrólise de pontes de hidrogênio; as moléculas de água fixam-se deixando livres grupos hidroxila, e os grânulos continuam a inchar, resultando no aumento da solubilidade do amido (STAHL, 2003).

3.2.4 SINÉRESE

A sinérese é um fenômeno causado pela liberação espontânea da água, acompanhada pela redução do volume e é intensificada por mudanças na temperatura, valor de pH e fatores mecânicos (DANNENBERG; KESSLER, 1988).

De acordo com Dreher et al. (1983), a resistência a sinérese é relacionada com diferentes componentes e características dos amidos. Primeiro, este fenômeno foi atribuído à agregação das moléculas de amilose através das pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Segundo esses autores, há uma relação diretamente proporcional entre o conteúdo de amilose e a ocorrência da sinérese, isto é, quanto mais amilose, maior será a liberação de água. Hoover e Sosulski (1991) atribuem a intensidade desse fenômeno à combinação de diversos fatores: conteúdo de amilose, grau de associação entre os componentes do amido, comprimento das cadeias de amilopectina e grau de polimerização da amilose e amilopectina.

Segundo Thys (2009), a sinérese do amido de pinhão é significativamente menor do que a do amido de milho após refrigeração por 28 dias, indicando que o amido de pinhão é menos propenso à retrogradação. De acordo com a autora, esse fenômeno explica-se devido à menor quantidade de amilose do amido de pinhão em relação ao de milho, resultando numa menor probabilidade de retrogradação. Dessa forma, o amido de pinhão apresenta maior potencial de aplicação em produtos perecíveis que necessitam de armazenamento sob refrigeração.

3.2.5 HIGROSCOPICIDADE

A relação existente entre a água e os outros componentes de um produto define a sua higroscopicidade, que é muito marcante nos produtos alimentícios (LABUZA, 1975). Os valores de umidade de equilíbrio dos produtos biológico dependem da espécie, variedade, teor de umidade inicial e, principalmente, da temperatura e umidade relativa do ambiente em que se encontram (SAMANIEGO-ESGUERRA et al. 1991; CHEN; JAYAS, 1998).

O amido, por ser um produto higroscópico, tem a propriedade de absorver ou “perder” água para o ambiente, tendendo a manter relação de equilíbrio entre o seu teor de água e o do ambiente. A água presente em um alimento está sujeita a interações que podem modificar não apenas suas propriedades, mas também aquelas dos materiais com os quais interagem (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998). Portanto, a higroscopicidade de um alimento está ligada

à sua estabilidade física, química e microbiológica, e, por isso, torna-se importante o conhecimento do comportamento higroscópico desses produtos.

A construção de uma isoterma de equilíbrio higroscópico é de fundamental importância, pois permite previsões da estabilidade e de variação na qualidade do produto durante seu acondicionamento e armazenamento (HOSSAIN et al., 2001).

Segundo Al-Muhataseb et al. (2004) o tipo de isoterma de amidos é atribuída a pontes de hidrogênio formadas pela molécula de água e os grupamentos hidroxila disponíveis nas regiões amorfas e nas superfícies das regiões cristalinas, sendo que nessas últimas ocorre uma resistência típica à penetração do solvente. Segundo esses pesquisadores, a água afeta a estrutura do grânulo de amido, pois tem um efeito plastificante das regiões amorfas que é reduzido sob baixos valores de atividade de água, restringindo, assim, a mobilidade dessa região. Entretanto, sob valores mais altos de atividade de água, a umidade adsorvida causa maior solubilidade do biopolímero, reduzindo sua cristalinidade e aumentando a disponibilidade de grupos polares para estabelecer ligações com a água, gerando a formação de ligações entre a água e o polissacarídeo.

3.2.6 CLARIDADE DA PASTA

Clareza de pasta é um dos atributos do amido para aplicação em alimentos, e pode ser definida como transparência. Este parâmetro varia consideravelmente com a origem botânica e pode ser alterado por modificação química dos grânulos (CRAIG et al., 1989).

A clareza de pastas tem relação não somente com fatores estéticos, mas também com outras características tecnológicas. Geralmente, amidos com alta tendência à retrogradação produzem pastas mais opacas (CIACCO et al., 1982).

Segundo Craig et al. (1989), a clareza e pasta pode ser dividida em três categorias: pasta transparente (apresenta pouca ou nenhuma estrutura granular e nenhuma associação de cadeias após a formação da pasta), pasta moderadamente transparente (possui pouca ou nenhuma estrutura granular, porém com substancial associação das cadeias depois do empastamento) e a pasta opaca (intumescimento granular remanescente com pouca associação de cadeias após a formação de pasta, mostrando-se opaca devido a estrutura

granular que permanece e que causa refração da luz em diferentes extensões e distorce imagens).

A elevada claridade em uma suspensão de amido pode ser explicada por baixos teores de amilose. Enquanto a diminuição da claridade da pasta como consequência do armazenamento pode ser atribuída à reassociação das cadeias de amilose e amilopectina que conduziriam ao desenvolvimento de zonas funcionais que dispersariam significativas quantidades de luz (PERERA; HOOVER, 1999; OLIVEIRA, 2007; SODHI; SINGH, 2003).

3.2.7 COLORIMETRIA

Análise colorimétrica mede a variação da cor de um sistema, devido à modificação da concentração de certo componente presente na mesma. Essa metodologia fornece três parâmetros: L^* (indica teores de luminosidade), a^* (intervalo entre coloração negativa verde e positiva vermelho) e b^* (intervalo entre a coloração negativa azul e positiva amarela) (CÓRDOVA, 2006).

Os valores de L^* variam de 0 (totalmente preta) a 100 (totalmente branca). A coordenada de cromaticidade a^* varia de -80 (verde) a +100 (vermelho) e a coordenada de cromaticidade b^* varia de -50 (azul) a +70 (amarelo) (MINOLTA, 1998).

3.2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Esta é uma técnica muito versátil, usada rotineiramente para análises micro-estrutural de materiais sólidos (DUKE; MICHETTE, 1990; WHISTON, 1987). Seu aumento máximo é maior que o microscópio óptico e menor que o microscópio eletrônico de transmissão, apresenta uma resolução, na ordem de 2 a 5 nm e facilidade no preparo das amostras (UGUCIONI, 2005).

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de amostras sólidas. É um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida

quando as amostras são observadas. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (NAGATANI et al., 1987; DEDAVID et al., 2007).

Thys (2009) observou, através de imagens obtidas por MEV, que, em relação às formas geométricas do grânulo do amido do pinhão, predominam as ovais e elipsóides truncados ou hemisféricos. De acordo com a autora, o diâmetro médio desses grânulos encontra-se na faixa de 7 a 20 μm , apresenta superfície bastante lisa e não possui irregularidades ou porosidade superficial. Esta característica, segundo Bello-Pérez et al. (2006a), reduz a possibilidade de ocorrência de reatividade do amido quando modificado quimicamente, assim como em suas propriedades funcionais e físico-químicas.

3.2.9 ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS)

A espectroscopia de espalhamento de luz é um método não destrutivo para o estudo de fluidos complexos, incluindo soluções de polímeros e biopolímeros, suspensão coloidais, sistemas de micelas e nanopartículas de uma forma geral. Trata-se de uma metodologia que utiliza a luz visível como fonte de energia e ângulos de observação facilmente obtidos para detecção da luz espalhada. Pode-se dimensionar partículas em solução ou suspensão, com tamanhos entre 2 nm e 500 nm. A espectroscopia de espalhamento de luz pode ser classificada como estática, através da qual se determina a massa molar e o raio de giro, ou dinâmica, que determina o raio hidrodinâmico e a polidispersão (SCHMITZ et al., 2011).

O índice de polidispersividade é um parâmetro muito importante nos resultados de espalhamento dinâmico. Para índices acima de 0,7 os resultados obtidos para espalhamento dinâmico não são confiáveis, pois relacionam-se a amostras bastante polidispersas. Índices abaixo de 0,08 compreendem materiais quase monodispersos (BRANDÃO, 2008).

A técnica DLS, assim como todas as técnicas granulométricas, pode ser usada para monitorar a coagulação das partículas. Nesse caso o que é lido é o tamanho do aglomerado, e não da partícula individual, sendo uma importante ferramenta na investigação do grau de dispersão de suspensões (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997)

3.2.10 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Os raios-X são emissões eletromagnéticas de natureza semelhante à luz visível, porém com comprimentos de onda extremamente pequenos. São produzidos quando qualquer partícula eletricamente carregada colide com um anteparo. Elétrons são normalmente utilizados nesta função, sendo que para este fim deve haver mínima diferença de potencial responsável pela aceleração destes elétrons em direção ao anteparo, produzindo raios-x que irradiam em todas as direções (SPOMBERG, 2010).

A difração é um fenômeno característico do movimento ondulatório, e pode ser observada quando uma onda é “deformada” por um obstáculo de dimensões próximas ao seu comprimento de onda. A unidade de medida utilizada para comprimentos de onda de raios-X é o angstrom (Å), equivalente a 10^{-10} m, e no espectro eletromagnético, os raios-X ocupam uma faixa entre 0,01Å e 100Å. No entanto, utiliza-se em difração a faixa de 0,5 a 2,5Å, já que os raios-X com comprimentos de onda da ordem de 1Å são da mesma ordem das dimensões dos espaçamentos atômicos nos cristais (CULLITY; STOCK, 2001).

A difratometria de raios X permite identificar a natureza botânica dos amidos e as características de sua estrutura cristalina do interior de seus grânulos através do empacotamento de amilose e amilopectina (SINGH et al., 2003; LACERDA, 2006).

O amido do pinhão apresenta um diagrama do tipo C (mistura dos tipos A e B), índice de cristalinidade de $23,3 \pm 0,3\%$ e frações dos alomorfos de $60 \pm 2\%$ (espectro do tipo B) e $40 \pm 2\%$ (espectro do tipo A) (THYS, 2008).

3.2.11 SPRAY DRYING

De acordo com Mayor e Sereno (2004), a desidratação é um dos processos mais comuns utilizados para melhorar a estabilidade dos alimentos. Os principais objetivos pelos quais a indústria alimentícia recorre à secagem podem ser resumidos nos seguintes pontos: aumentar o período de conservação dos alimentos através da inibição do crescimento de microrganismos, a atividade de algumas enzimas e determinadas reações químicas por

redução da atividade de água; reduzir o peso e o volume dos alimentos, diminuindo os custos de armazenagem e transporte e, em algumas situações, a desidratação permite obter a diversificação da oferta de produtos, assim como permite a obtenção de novos produtos aos consumidores (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A secagem por atomização é uma técnica relativamente barata, e a mais utilizada pela indústria de alimentos para microencapsular compostos; as variáveis deste processo correspondem às temperaturas do ar de entrada e saída do secador, ao fluxo de ar ou fluido de arraste, à distribuição de temperatura e umidade, ao tempo de residência e à geometria da câmara de secagem (GIBBS, 1999).

O spray-drying é uma operação unitária através da qual uma solução ou emulsão é pulverizada numa corrente de gás quente (corrente ou contracorrente) para, instantaneamente, obter pó, que pode atingir desde dimensões muito finas (10-50 μm) a partículas de grande dimensão (2-3 mm). O ar é o gás habitualmente usado, porém ocorre o uso de gás inerte, como o nitrogênio (MARTÍNEZ et al. 2004).

A dimensão das partículas obtidas aumenta quanto menor for a temperatura utilizada e maior for a viscosidade e a tensão superficial do líquido. Ao manter a temperatura constante, o tamanho das partículas aumenta com o aumento da alimentação da amostra (RISH, 1995).

A secagem por atomização apresenta diversas vantagens e desvantagens, as quais podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens do uso da técnica de spray drying.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Baixo custo de operação	Não produz materiais com tamanho uniforme
Alta qualidade das partículas obtidas	Limita a escolha do encapsulante (baixa viscosidade em altas concentrações)
Bom rendimento de processo	Não é uma boa técnica para materiais sensíveis ao calor (enzimas)
Produção de matéria com boa solubilidade	Custo do equipamento
Tamanho pequeno de partícula	
Alta estabilidade dos materiais obtidos	

Fonte: GOUIN, 2004, DESAI e PARK, 2005; MADENE et al., 2006; SANTOS et. al. 2003.

3.3 AMIDOS MODIFICADOS

O amido é o agente espessante e geleificante mais utilizado na indústria de alimentos, permitindo o desenvolvimento de grande número de produtos, como pudins, sopas, flans, cremes, molhos, maioneses, alimentos prontos e semi-prontos para o consumo, entre outros (THYS, 2009).

Entretanto, frequentemente os amidos nativos ou naturais não são os mais adequados para processamentos específicos. As modificações do amido nativo são feitas para proporcionar produtos amiláceos com as propriedades necessárias para usos específicos. As várias formas de se conseguir modificar os amidos nativos são de alterar uma ou mais das seguintes propriedades: temperatura de pasta, relação sólidos/viscosidade, resistência das pastas de amido à quebra de viscosidade por ácidos, calor e/ou agitação mecânica (cisalhamento), tendência de retrogradação, caráter iônico e hidrofílico (SWINKELS, 1996). A modificação de amidos permite também melhorar a retenção de água, aumentar a estabilidade, melhorar a sensação ao paladar e brilho, geleificar, dispersar ou conferir opacidade (NATIONAL STARCH & CHEMICAL INDUSTRIAL, 1997).

Mudanças estruturais como a retrogradação afetam negativamente a qualidade de alguns produtos com o tempo. Isto conduz à baixa estabilidade e à fraca resistência à tensão de cisalhamento, pH, pressão e mudanças de temperatura durante processos tecnológicos bem como durante a estocagem do produto final (SIKORA et al., 2004).

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 de amido, uma ou mais propriedades funcionais são alteradas, o que favorece a sua aplicação em uma nova gama de produtos que, antes da modificação, não aconteceria (THYS, 2009).

O amido pode ser extraído de diferentes espécies botânicas por diferentes técnicas de purificação. O desenvolvimento de métodos de extração para isolar grânulos com alto grau de pureza e propriedades físicas bem definidas tem aumentado devido a utilização de amido como aditivo na indústria de alimentos. Vários protocolos de extração têm sido estudados para melhorar o rendimento da extração enquanto os grânulos de amido são mantidos intactos. Entretanto, alguns desses métodos provocam mudanças irreversíveis na estrutura do amido, prejudicando seu uso em muitas aplicações industriais. A avaliação das modificações nos grânulos de amido e suas correlações para o procedimento de extração é crucial (THYS et al., 2008).

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. Desse processo pode-se obter um polímero com grande aplicabilidade como substituto de gordura (ZAMBRANO; CAMARGO, 2001).

As modificações podem ser divididas em físicas, químicas, enzimáticas e combinadas. A geleificação e a posterior eliminação da umidade do amido permitem a obtenção de amidos pré-gelatinizados, solúveis em água e base para a confecção de alimentos previamente preparados (CEREDA, 2003).

A modificação da molécula de 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 3. Estas modificações alteram profundamente a gelatinização dos grânulos de amido nativo, assim como seu comportamento quando na forma de pasta e sua retrogradação (SINGH; ALI., 2000).

Tabela 3. Tipos de modificação da molécula de amido e técnicas de preparação

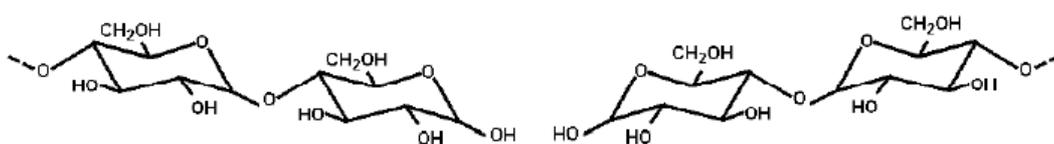
MODIFICAÇÃO	TIPO	TÉCNICA DE PREPARO
FÍSICA	Aquecimento/ Umidificação	1) Aquecimento do amido a temperaturas maiores que a temperatura de gelatinização, com umidade insuficiente para causar o processo de gelatinização 2) Anelamento: aquecimento do amido a temperaturas menores do que a temperatura de gelatinização 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 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 pirodextrina, preparado por tostagem do amido acidificado.
DERIVATIZAÇÃO	Esterificação	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 trimerafosfato de sódio ou oxiclreto de fósforo. 3) Combinação dos tratamentos 1 e 2.

Fonte: (SINGH; ALI., 2000).

3.3.1 HIDRÓLISE ÁCIDA

Amidos *acid-thinned*, *thin-boiling* e *fluidity starches* são todos os termos que se referem ao amido que tenha sido modificado por hidrólise ácida. Há alguns anos, essa metodologia tem sido usada para modificar a estrutura dos grânulos do amido e produzir “amido solúvel” (MURPHY, 2000). Na hidrólise ácida, o íon hidrônio (H_3O^+) ataca o átomo de oxigênio e hidrolisa a ligação glicosídica (Figura 3) (JAYAKODY; HOOVER, 2002).

Figura 3 - Amido ácido modificado.



Fonte: WURZBURG (1989) - adaptado

A hidrólise do amido depende da consistência do grânulo, acidez do meio, temperatura e duração da reação (BARROS, 1984). A reação de hidrólise inicia pela ação do ácido sobre a região amorfa do grânulo, que fica mais suscetível à degradação, e ocorre mais rapidamente devido a interação de diversos fatores como a amilose, complexo amilose-lipídio e a presença de poros na superfície do grânulo. Após essa etapa, a região cristalina é atacada, com velocidade de reação muito mais lenta devido à interação de fatores como o conteúdo de amilopectina, a extensão da distribuição das ligações $\alpha - (1-6)$ neste polímero entre as áreas amorfas e cristalinas e o grau de empacotamento das duplas hélices dentro da área cristalina (FRENCH, 1973; JAYAKODY; HOOVER, 2002).

As diferenças entre a razão e a extensão da hidrólise ácida entre amidos de cereais, tuberosas e legumes têm sido atribuídas a diferenças no tamanho dos grânulos, extensão das interações de amido das regiões amorfa e cristalina dos grânulos, extensão de fosforilação, quantidade de ligações $\alpha 1-6$, cadeias de complexos de amilose-lipídio e extensão da distribuição das ligações $\alpha 1-6$ entre os domínios amorfo e cristalino (JAYAKODY; HOOVER, 2002).

Os ácidos minerais, comumente usados, são os ácidos clorídrico e sulfúrico (FENNEMA, 2000). A aplicação dessa técnica resulta em amidos com menor massa molar, o que resulta num maior conteúdo de grupos aldeídos livre, menor viscosidade, maior solubilidade em água quente, menor sinerese (WHISTLER; DANIEL, 1990), menor afinidade

com iodo e maior temperatura de gelatinização (RADLEY, 1976). Porém, não apresenta mudanças significativas na sua forma granular, tem birrefringência similar e, basicamente, a mesma insolubilidade em água fria, quando comparado com o amido nativo (DONOVAN; BERKELEY, 1980).

Modificações ácidas têm sido aplicadas para proporcionar melhorias nas propriedades físico-químicas do amido, particularmente na indústria de alimentos. A modificação ácida permite que o amido possa ser usado a altas concentrações de sólidos devido a sua alta capacidade de formação de gel (LAWAL et al., 2005).

Alguns apresentam os amidos nanométricos como nanocristais preparados por hidrólise ácida (KRISTO; BILIADERIS, 2007). Entretanto, essa metodologia reduz a ultraestrutura do amido a fibrilas de porção cristalina, retirando demasiadamente a característica semicristalina do amido e, portanto, desestruturando o grânulo tal e qual ele é utilizado na indústria.

Albanus (2009) concluiu em seu trabalho que o nanoamido produzido por ela pode substituir o amido micrométrico em suas aplicações industriais, pois o processo de miniaturização dos grânulos não comprometeu a estrutura interna do amido.

3.3.2 ULTRASSOM

As ondas sonoras audíveis estão na faixa de frequência de 20 a 20.000 Hz e as faixas de onda ultra-sônica são aquelas com frequência acima de 20.0000 Hz. As ondas com frequência abaixo de 20 Hz são as ondas infra-sônicas. Nas aplicações em engenharia, as frequências de ultrassom estão na faixa de 2 a 20 MHz que promovem o balanço entre atenuação (redução de sinal), dispersão e largura do feixe (McCARTHY et al., 2005).

O tratamento ultrassônico é conhecido como um tratamento não convencional, ecologicamente correto e efetivo usado para promover modificações químicas em polímeros (ALIYU, HEPHER, 2000; BAXTER; ZIVANOVIC; WEISS, 2005), inativação de microrganismos (CAMERON, MCMASTER, BRITZ, 2008), e ruptura de membranas fosfolipídicas (ANDRADE et al., 2004; LIMA; ANDRADE, 2007). A exposição de soluções contendo polímeros a radiações ultrasônicas de alta intensidade apresenta como primeiro

efeito a redução da massa molar. A hidrólise ocorre preferencialmente próxima ao meio da cadeia, sem causar alteração da estrutura química (PRICE; SMITH, 1993; MADRAS; KUMAR; CHATTOPADHYAY, 2000).

Segundo Mason (1998), na indústria de alimentos as aplicações de ultrassom são utilizadas para emulsificação, homogeneização, cristalização (formação de pequenos cristais de gelo no congelamento), filtração, separação, alteração de viscosidade, inativação enzimática e de bactérias através da quebra da membrana celular.

Particularmente para as moléculas de amido, a massa molar dos seus componentes tem influência significativa em muitas das suas propriedades, tais como absorção de água e solubilidade. No caso do amido, a sonicação tem sido usada para promover a desagregação das moléculas de amido retrogradadas (SEGUCHI, HIGASA, MORI, 1994), a hidrólise de grânulos gelatinizados (CHUNG, MOON, KIM, CHUN, 2002), a diminuição da viscosidade (IIDA, TUZIUTI, YASUI, TOWATA, KOZUKA, 2008).

Em estudo realizado por Mulet e colaboradores (2003), a submissão prévia de alimentos a ultrassom antes de realizada a secagem tem se mostrado muito eficiente. De acordo com estes autores, a aplicação de pulsos eletromecânicos previamente à secagem de alimentos promove aumento na cinética do transporte de massa, proporcionando maior eficiência no processo de secagem, principalmente ao tratar de sistemas sólido-líquido (desidratação osmótica, por exemplo).

Verifica-se a ocorrência do fenômeno chamada de cavitação quando há a aplicação de sonicação em sistemas líquidos, como suspensões (MASON, 1998). Segundo Portenlaenger e Heusinger (1997), a cavitação é o efeito primário que leva a iniciação das reações químicas no sistema. As bolhas de reação de cavitação rapidamente induzem a altos gradientes de pressões e altas velocidades locais da camada de líquida na vizinhança. Essas cavitações podem causar forças de cisalhamento que não apresentam influência significativa em moléculas pequenas, mas são capazes de hidrolisar as cadeias de polímeros maiores. Essa é a ação químico-mecânica do ultrassom em polímeros, como ocorre com as moléculas de amido, por exemplo. Segundo Borges e Korn (2002), o processo de cavitação e as temperaturas geradas no colapso dependem da pressão de vapor do solvente. Moléculas de água, que possuem altas pressões de vapor, podem penetrar nas cavidades e, no momento do colapso, sofrerem sonólise (fenômeno

envolvido da cisão homolítica de ligações O-H) e resultarem na formação de novos produtos, como H₂ e H₂O₂.

A sonicação pode gerar efeitos químicos através da geração de espécies reativas. A sonólise da água ocasiona a produção direta dos radicais livres (H• e OH•) através da hidrólise das ligações H-O nas moléculas de água e produção de peróxido de hidrogênio no meio irradiado, conforme ilustração abaixo (KORN; ANDRADE; BORGES, 2003).



De acordo com Jambrak e colaboradores (2010), os efeitos do emprego de ultrassom em alta frequência (24 KHz) nas propriedades físicas e reológicas do amido de milho é uma técnica promissora na modificação desses grânulos, devido a sua modificação pelas forças cavitacionais proporcionadas pela aplicação de ultrassom.

3.4 APLICAÇÕES DO AMIDO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Como o amido é um biopolímero versátil de baixo custo, ele tem sido amplamente usado na indústria de alimentos e em muitas aplicações industriais (JOBILING, 2004; SONG et al., 2009).

Na indústria de alimentos, 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-cristalinizantes (do açúcar) ou adoçantes. Da mesma forma são utilizados os derivados de processos de isomerização do amido (FRANCO et al., 2002).

O amido e os amidos modificados apresentam numerosas aplicações, incluindo a promoção de adesão e a função de ligante, turbidez, polvilho, elemento de recobrimento

(filmes de cobertura), reforçador de espuma, gelificante, vitrificante, retenção de umidade, estabilizante, texturizante e espessante (WURZBURG, 1986).

De maneira geral, os amidos atuam como estabilizantes 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, pães, e outros (ZAMBRANO; CAMARGO, 1999).

O conteúdo de gordura de um produto pode ser diminuído substituindo-o total ou parcialmente por um componente menos energético. Um modo clássico seria utilizar agentes espessantes (PETRI, 1991). Carboidratos e produtos à base de carboidratos têm sido usados para substituir total ou parcialmente (de 50 a 100%) óleos e gorduras em grande variedade de alimentos por mais de uma década (SINGHAL; GUPTA; KULKARNI, 1991; ANON, 1990).

O amido degradado a compostos de menor peso molecular com DE (dextrose equivalentes) mais baixos tem propriedades que imitam a gordura (GLICKSMAN, 1969). Segundo Thys (2009), amidos modificados de pinhão que resultaram em valores de DE maiores que 2,5, com porcentagem de hidrólise maior que 0,95% formaram um gel termorreversível, indicando possuir aplicabilidade potencial do amido hidrolisado como substituto de gordura. Diferentes propriedades podem ser obtidas dependendo da fonte de amido utilizada e do tipo e grau de modificação aplicados. Amidos com grânulos de diâmetro similar às micelas de gordura (2 μ m) têm potencial como substituto de gordura. Este tamanho de partícula é conseguido através de hidrólise ácida ou enzimática, atrito mecânico ou microparticulação do amido (LUCCA; TEPPER, 1994).

Para o uso como substituto de gordura especificamente são recomendados amidos com 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; GLINSMANN, 1992), características que, segundo Bello-Pérez et al. (2006), encontram-se no amido de pinhão.

3.5 NANOAMIDOS

Inúmeras propriedades de materiais dependem do tamanho e da estrutura interna de seus constituintes. Nanomateriais, devido ao tamanho de suas partículas – na faixa de nanômetros 10^{-9} m – exibem propriedades exclusivas e diferentes qualitativamente das partículas de tamanhos maiores. O amido, matéria-prima amplamente disponível, é um bom substrato para a preparação de nanopartículas (GALLANT; BOUCHET, BLADWIN, 1997; MYERS et al., 2000).

As perspectivas de aplicações da nanotecnologia ao setor alimentício se tornaram mais evidentes nos últimos anos. Espera-se que as aplicações da nanotecnologia trarão mudanças ao setor, incluindo técnicas aperfeiçoadas de produção e processamento, materiais que têm contato com o alimento melhorado, modificação de sabor, textura e sensação, monitoria da qualidade e frescor dos alimentos, reduzido teor de gordura, absorção de nutrientes aumentada, e melhor rastreabilidade e segurança dos produtos alimentícios (GREINER, 2009).

Pesquisas relacionadas à aplicação da nanotecnologia no setor de alimentos incluem a melhora do sabor, cor, textura e consistência dos produtos alimentícios, aumento da absorção e biodisponibilidade dos nutrientes e compostos bioativos, aumento da qualidade, da vida de prateleira e da segurança dos alimentos devido ao uso de novos materiais de embalagem com proteção mecânica, barreiras e propriedades antimicrobianas, e nanosensores para rastrear e monitorar as condições do alimento durante o transporte e armazenamento (CHAUDHRY et al., 2008).

Nos últimos anos, a preparação e a aplicação de nanocristais/nanopartículas biodegradáveis tem atraído muito interesse na área de pesquisas. O amido, por ser um polímero natural biodegradável, é um bom candidato para a formação de nanocristais/nanopartículas (SONG; THIO; DENG, 2011). Recentemente, Le Corre, Bras e Dufresne (2010), publicaram uma revisão sobre a preparação, caracterização e aplicações de nanopartículas de amido, as quais têm muitas aplicações potenciais, como aditivos alimentares, compostos biodegradáveis, adesivos, entre outros.

Albanus (2009) miniaturizou os grânulos de amido até a escala nanométrica utilizando dois tipos de tratamento químico. A autora observou, através de microscopia óptica, que o mecanismo físico de miniaturização dos grânulos foi de descamação, isto é, uma desagregação das camadas externas que deixa intactas as camadas mais internas. Dessa forma,

a pesquisadora concluiu que o amido nanométrico produzido pode substituir o amido micrométrico em suas aplicações industriais, pois o processo de miniaturização não comprometeu a estrutura interna do grânulo.

3.6 APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS EM ALIMENTOS

As bacteriocinas são peptídios ou proteínas antimicrobianas sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos taxonomicamente relacionados (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). Muitas espécies de bactérias ácido-láticas que são produtoras de bacteriocina e apresentam potencial para aumentar o tempo de vida útil de alimentos já são conhecidas. Essas bacteriocinas normalmente apresentam amplo espectro de ação contra microrganismos deteriorantes de alimentos. As bactérias ácido-láticas podem ser utilizadas na indústria de alimentos como aditivos e bioconservantes, ao invés de algum aditivo químico, como conservantes, cuja função pode ser desempenhada por bacteriocinas (TEIXEIRA, 2007). Estudos para avaliação da atividade das bacteriocinas e sua quantificação têm sido realizados, utilizando-se o método de formação de halo de inibição. De acordo com Toledo (2000), esse método é o resultado da difusão da bacteriocina e da velocidade de crescimento do microrganismo indicador.

A nisina é uma bacteriocina naturalmente produzida por *Lactococcus lactis* em vários alimentos fermentados, especialmente produtos lácteos. A nisina tem o seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países e em 1988, o FDA concedeu-lhe o status de GRAS ("Generally Recognized As Safe"). A nisina, após testes toxicológicos e estudos de resistência cruzadas, foi considerada segura como aditivo, sendo digerida no sistema digestivo pela enzima quimotripsina (CLEVELAND et al., 2001). Essa bacteriocina é um peptídeo composto por 34 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 3,5 KDa e, de modo geral, possui amplo espectro de ação, atuando sobre diversas bactérias Gram-positivas e seus esporos e apenas contra alguns microrganismos Gram-negativos (NASCIMENTO et al., 2008; CARRIM, 2005; SCHULZ et al., 2005).

Entre os microrganismos de importância para a microbiologia de alimentos que são inibidos pela nisina, inclui-se a *Listeria monocytogenes*. Diversos alimentos têm sido

associados com a transmissão de *L. monocytogenes*, incluindo vegetais, produtos lácteos e cárneos (HELLSTRÖM et al., 2010). *L. monocytogenes* possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua contaminação em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento. Sua capacidade de colonização, multiplicação, e formação de biofilmes nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos tornam este microrganismo uma ameaça à indústria (RÓRVIK et al., 2003). Portanto, cuidados especiais, como adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, associadas às técnicas de conservação do produto final tornam-se imprescindíveis (FENLON, 1999; BERSOT et al., 2001; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Um dos problemas que ocorre na aplicação direta das bacteriocinas nos produtos alimentícios é a diminuição ou perda da atividade antimicrobiana, devido interações da bacteriocina com os componentes do alimento (JUNG et al., 1992; BRANEN E DAVISON, 2004; CHOLLET et al., 2008). Para proteger as bacteriocinas dessas interações indesejáveis pode-se fazer a encapsulação destas em lipossomas (JESORKA; ORWAR, 2008), ou através de atração eletrostática de nanopartículas de amido e os peptídeos antimicrobianos (BI et al., 2011). Luo e Stutzenberger (2008) concluíram que materiais em escala nanométrica possuem maior superfície de contato do que quando em micro-escala, e isto permite que sejam capazes de tomar um maior número de moléculas biológicas, conferindo maior eficácia antimicrobiana às nanopartículas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa etapa serão apresentadas as metodologias empregadas para a obtenção de nanoamidos e sua caracterização, a incorporação da nisina às moléculas de amido, assim como as matérias-primas, os reagentes, equipamentos e métodos de análise utilizados.

Todos os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), nos seguintes laboratórios: Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e Laboratório de Secagem e Engenharia de Processos em Alimentos (Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA), Instituto de Física, Instituto de Química, Centro de Microscopia Eletrônica e Instituto de Tecnologia Mineral (Departamento de Engenharia de Minas).

4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

Para realizar o presente trabalho foram utilizadas sementes de pinhão cultivadas na região de Nova Petrópolis, serra gaúcha, das safras de 2011 e 2012, adquiridas na Ceasa de Porto Alegre. O pinhão foi lavado com água corrente, seco à temperatura ambiente por 24 horas e selecionado, visualmente, para posterior congelamento em sacos de polietileno. A nisina em pó foi obtida da Danisco, o ácido clorídrico e o anidrido succínico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA) e os microtubos com membrana de 10KDa utilizados foram fornecidos pela Millipore.

4.1.1 EXTRAÇÃO DO AMIDO DE PINHÃO

O protocolo de extração do amido foi baseado na metodologia empregada por Bello-Pérez et al. (2006) com algumas adaptações. As sementes foram descascadas manualmente, com auxílio de uma navalha. As cascas, assim como a película interna que recobre superficialmente o endosperma foram retiradas e, em seguida, o pinhão foi triturado em um liquidificador de uso doméstico na proporção de 1 volume de semente para 2 volumes de água gelada. O material obtido foi passado em duas peneiras, primeiro em uma de 60 mesh,

seguida de uma de 200 mesh. O material permeado foi deixado em refrigerador (4-5°C) por aproximadamente 45 minutos para decantar. Ao final desse processo, o sobrenadante era descartado, o precipitado lavado novamente com água gelada e deixado em refrigerador novamente. Esse processo foi repetido quatro vezes.

O amido precipitado foi submetido à secagem em atomizador (LABMAQ LM 1.0), utilizando-se temperatura de entrada de 90 °C, temperatura de saída de 55 °C e vazão de 0,61 L/min (Figura 4). A opção por esse tipo de secagem foi o reduzido tempo de processamento.

Figura 4 - Atomizador LABMAQ LM 1.0.



Fonte: Autor (2013)

4.1.2 TRATAMENTO DO AMIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA

Para hidrólise ácida utilizou-se o método descrito por Albanus (2009). Pesou-se 1,1g do amido e diluiu-se em 25 mL de solução de HCl 2%. Essa mistura foi mantida em tubos falcon, mantidos a temperatura ambiente, os quais eram agitados diariamente. A cada sete dias, as amostras foram analisadas em DLS a fim de verificar se já haviam atingido escala nanométrica, o que ocorreu após transcorridos 49 dias. Decorrido esse tempo, com o objetivo de retirar o ácido da solução e com isso interromper a reação, aos 50 dias de reação, foram realizadas cinco lavagens nas amostras, utilizando-se água destilada e centrifugando-se (centrífuga Sigma 4K 15) ao final de cada ciclo (10.000 rpm / 15 minutos / 7°C). O material

obtido foi submetido à secagem em atomizador, nas mesmas condições descritas no item 4.1.1.

4.1.3 TRATAMENTO DO AMIDO POR ULTRASSOM

Neste tratamento, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Izidoro (2011) com adaptações, que consistiu em preparar uma solução com 20 gramas de amido diluídos em 500 mL de água destilada. Esta mistura foi submetida a ondas ultrassônicas (Unique DE S500), utilizando-se macro ponta de titânio de 13 mm de diâmetro, em banho de gelo, com potência de 100W e frequência ultrassônica de 20 KHz durante 1 hora, com intervalos de 1 minuto de sonicação e 1 minuto de repouso. Após, foi submetida à secagem em atomizador, conforme item 4.1.1.

Preliminarmente, testaram-se potências de 60, 80 e 100W, conforme protocolo acima, mantendo-se constante o tempo de reação. Estes materiais foram analisados em espalhamento de luz dinâmico para verificar qual apresentava moléculas em tamanhos de ordem nanométrica.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata para o amido nativo e para os dois tratamentos (hidrólise ácida e ultrassom).

4.2.1 UMIDADE

O teor de umidade foi medido considerando-se a perda de peso do produto quando submetido a aquecimento em estufa a 105°C, segundo protocolo 945.15 (AOAC, 1990).

4.2.2 ATIVIDADE DE ÁGUA

A medição foi realizada através do uso do equipamento Aqualab modelo S37E, método número 978.18 (AOAC, 1990).

4.2.3 TEOR DE FIBRA BRUTA

A determinação da fibra bruta foi baseada na determinação de resíduos orgânicos insolúveis da amostra, após uma digestão ácida e outra alcalina, utilizando-se o protocolo 962.09 (AOAC, 1990)

4.2.4 TEOR DE CINZAS

A metodologia utilizada para determinar o teor de cinzas foi baseada na determinação da perda de peso do material submetido à queima em mufla a temperatura de 550°C, através do protocolo 923.03. A determinação de cinzas permite verificar a adição de matérias inorgânicas ao alimento (AOAC, 1990).

4.2.5 TEOR DE LIPÍDEO

O processo utilizado para determinar lipídios é iminente gravimétrico e está baseado na perda de peso do material submetido à extração, em um extrator Soxhlet, com éter petróleo (AOAC, 1990).

4.2.6 TEOR DE PROTEÍNA

A quantidade de proteína foi determinada utilizando-se o método Kjeldall através do protocolo 2055, o qual determina a matéria nitrogenada total de uma amostra (AOAC, 1990), utilizando-se fator de conversão de 6,25.

4.2.7 TEOR DE AMIDO

A determinação do teor de amido foi realizada baseada na metodologia de análise de amido do Instituto Adolfo Lutz (1985), o qual se utiliza do método de Eynon/Lane para açúcares redutores, que se baseia na redução de um volume conhecido de um reagente de cobre alcalino (Fehling) a ácido cuproso. O ponto final é indicado pelo azul de metileno, que é reduzido a sua forma leuco por um pequeno excesso de açúcar redutor.

4.2.8 TEOR DE AMILOSE

Para determinar o teor de amilose da amostra seguiu-se a metodologia seguida por Izidoro (2011), na qual se utilizou o método colorimétrico do iodo simplificado, que se baseia na transmissão da luz através de um complexo colorido que a amilose forma ao reagir com o iodo.

4.2.9 TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

A determinação de açúcares redutores foi feita através do método de DNS, conforme Silva (2008). Construiu-se uma curva padrão de glicose com concentrações de 0,004 a 5 mg/mL. Depois de realizadas as diluições da curva padrão, foram pipetados 100 µL de cada uma em tubos de ensaio e, em seguida, adicionado 1 mL de ácido 2,5-dinitrosalicílico (DNS). Estes tubos foram levados a banho-maria (THERMOMIX BM, B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL 18 BV) a 99°C por 5 minutos e resfriados a temperatura ambiente. Após foram lidos em espectrofotômetro (UV-MINI 1240, SHIMADZU) a absorvância de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com as amostras, a fim de verificar a concentração de açúcares redutores presentes.

4.2.10 COLORIMETRIA

Foi medida utilizando-se o equipamento Chroma Meter (modelo CR-400, Konica Minolta). Foram determinados os parâmetros a^* , b^* e L^* através da aproximação do equipamento nas amostras que estavam dispostas em uma cápsula de vidro.

4.3 SOLUBILIDADE

Utilizou-se o método de Eastman & Moore (1984) citado por Cano-Chauca et al. (2005), modificado por Spada (2011), através do qual se mediu a solubilidade em água fria (20°C). Preparou-se uma solução contendo 1g da amostra e 100 mL de água destilada, a qual foi mantida sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. Esta solução foi centrifugada (5000 rpm / 5°C / 5 minutos). Adicionou-se 10 mL do sobrenadante em um becker, o qual foi colocado em estufa a 105°C até secar (aproximadamente 3 horas). Através da diferença de peso do becker foi calculada a solubilidade

4.4 SINÉRESE

Para determinar o percentual de água liberada das amostras, foram preparadas suspensões com concentração de 2% em tubos de centrífuga, as quais foram submetidas a banho-maria (THERMOMIX BM, B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL 18 BV) a 85°C por 30 minutos com agitação para gelatinizar. Em seguida, foram resfriadas em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas em refrigerador e analisadas depois de transcorridas 24, 48, 72 e 120 horas. A sinérese foi medida como o percentual (%) de água liberada após a centrifugação (centrífuga HERMLE Z323K) das amostras (1500g / 15 minutos) (SINGH et al., 2004).

4.5 HIGROSCOPICIDADE

A higroscopicidade foi medida baseada no método desenvolvido por Cai & Corke (2000) com algumas modificações. Nessa metodologia, pesou-se aproximadamente um grama da amostra em um becker de 10 mL, o qual foi colocado em recipiente de vidro contendo solução de NaCl (75%). Este foi hermeticamente fechado e posto em uma incubadora (modelo 411FPD, Ethiktechnology) com temperatura constante de 25°C. O béquer foi pesado até que seu peso atingisse o equilíbrio. A higroscopicidade foi expressa em gramas de umidade absorvida por 100 gramas de sólidos secos (g/100g).

4.6 CLARIDADE DA PASTA

Nesta metodologia foram preparadas suspensões de amido na concentração de 1%, as quais foram gelatinizadas em banho-maria (THERMOMIX BM, B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL 18 BV), com agitação, a 90°C por 1 hora, e, em seguida, foram resfriadas por 1 hora a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as amostras foram armazenadas em refrigerador (4-5°C). A absorvância das amostras foi analisada conforme Singh et al. (2004) em 24, 48, 72 e 120 horas em espectrofotômetro (UV-MINI 1240, SHIMADZU), no intervalo de luz visível de 640 nm. O percentual de transmitância foi calculado de acordo com Torre-Gutiérrez et al. (2008):

$$(\%T) = 10^{(2-A)},$$

Onde %T é o percentual de transmitância

e A é a absorvância

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise da morfologia dos grânulos de amido seguiu a metodologia desenvolvida por Thys et al. (2008) com adaptações. Nessa análise foi utilizado o microscópio JEOL JSM-6060 (JEOL, Tóquio, Japão) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, o qual possui uma faixa de magnificação de 18 X a 300.000 X. As amostras em pó foram colocadas sobre *stubs*

com uma fita adesiva dupla-face e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas utilizando-se uma voltagem de aceleração de 10KV.

4.8 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

Esta análise mediu o diâmetro médio das partículas de amido nativo de pinhão. Utilizou-se o equipamento Cilas 1064 Particle Size Analyser do Instituto de Tecnologia Mineral (Departamento de Engenharia de Minas) da UFRGS, o qual atua numa faixa de 0,04 a 500 μm . A amostra foi colocada lentamente em uma suspensão líquida até atingir concentração de aproximadamente 10%. Cada suspensão foi submetida à sonicação e a uma lenta agitação contínua para evitar a agregação das moléculas.

4.9 ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS)

Nessa análise, realizada no Instituto de Química da UFRGS, apenas os amidos submetidos aos tratamentos de hidrólise ácida e ultrassom foram analisados, visto que o DLS analisa apenas moléculas com tamanhos nanométricos. A preparação das amostras consistiu em diluir 0,15 g de amido em 10 mL de água Milli-Q, as quais eram filtradas em membranas de 0,22 μm . O tamanho e a polidispersividade (PDI) das partículas foi determinado no equipamento de espalhamento de luz dinâmico (DLS) Brookhaven, com configurações padrões (BI-200M goniômetro, correlator digital BI-9000AT) e um laser He-Ne de 35 mV com λ de 632,8 nm como fonte de luz. O valor aparente do raio hidrodinâmico – R_h – foi determinado pelo DLS no ângulo de 90° através da relação Stokes-Einstein usando o coeficiente de difusão D_{app} dado pela fórmula abaixo (equação 1):

$$D_{app} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (1)$$

onde, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η_0 é a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico.

4.10 DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)

A definição do índice de cristalinidade foi feito através de difração de raio-x, no equipamento de Difractometria de Raios X (Simens modelo D500), no Instituto de Física. A radiação utilizada foi Cu (comprimento de onda de 1,542 Å) a um tempo de varredura de 0,5 s. A região de varredura do ângulo de difração foi de 3-70° (2θ), usando um gerador de tensão de 40 kV e uma corrente emissora de 17,5 mA.

4.11 INCORPORAÇÃO DE NISINA AO AMIDO DE PINHÃO

4.11.1 MODIFICAÇÃO DA CARGA DO AMIDO DE PINHÃO NATIVO E DO NANOAMIDO DE PINHÃO SONICADO

Nesta etapa da pesquisa, utilizou-se apenas o amido nativo de pinhão e o que teve sua estrutura modificada por ondas ultrassônicas. A metodologia utilizada foi a proposta por Scheffler et al. (2010), na qual se preparou uma solução de amido (20%), diluída em água duplamente destilada e adicionou-se, lentamente, 10% de anidrido succínico, baseado no peso de glucanos, mantendo o pH da solução entre 8,5 e 9, usando NaOH 2%. Esta solução permaneceu em repouso, a temperatura ambiente, por 24 horas. Decorrido esse tempo, reduziu-se o pH para 6,5, utilizando-se HCl 2%. Após, adicionou-se 3 volumes de etanol e a amostra foi centrifugada (3000g / 8 minutos). O sobrenadante foi descartado e o ciclo foi repetido três vezes. Por fim, o material precipitado foi colocado em uma capela para remover o resíduo de etanol.

4.11.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NISINA

A solução foi preparada conforme metodologia proposta por Bi et al. (2011). Para isso, foram pesadas 120 mg de nisina sólida e adicionados 3 mL de tampão acetato de sódio (50mM, pH 5,5). Esta solução foi mantida sob agitação lenta por 15 horas. Transcorrido esse tempo, a amostra foi centrifugada (5000g / 5 minutos / 15°C) e o sobrenadante (1000 µg/mL de solução de nisina) foi coletado.

4.11.3 ADIÇÃO DA NISINA ÀS PARTÍCULAS

Nesta etapa, foram preparadas duas soluções, conforme sugerido por Bi et al. (2011). Uma delas continha 2,7 mL de solução de amido nativo com carga modificada (1 mg/mL) e 0,3 mL de solução de nisina diluída (200 µg/mL) em tampão de acetato de sódio. A outra, 2,7 mL de solução de amido sonificado com carga modificada (1 mg/mL) e 0,3 mL de solução de nisina diluída (200 µg/mL) em tampão de acetato de sódio. Essas soluções ficaram em repouso por 24 horas a temperatura ambiente para que a interação eletrostática ocorresse.

4.11.4 POTENCIAL ZETA

Foi avaliado o potencial zeta das seguintes amostras: amido nativo de pinhão, amido sonificado, amido nativo com carga modificada pelo anidrido succínico, amido sonificado com carga modificada pelo anidrido succínico, amido nativo com carga modificada pelo anidrido succínico adicionado de nisina, amido sonificado com carga modificada pelo anidrido succínico adicionado de nisina. As duas últimas foram preparadas conforme descrição do item 4.11. Para as demais, prepararam-se soluções de 3mg/mL, diluídas em tampão de acetato de sódio. Todas as medições foram feitas no Instituto de Química da UFRGS, no equipamento Zeta PALS da Brookhaven.

O cálculo do potencial zeta é feito através da determinação da mobilidade eletroforética e depois aplicando a equação Henry. A mobilidade eletroforética é obtida através da realização de um ensaio de eletroforese sobre a amostra e medindo a velocidade das partículas utilizando Laser Doppler Velocimetry (LDV) (NBTC, 2013).

4.11.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As amostras, preparadas conforme o item 4.11.3, foram centrifugadas (centrífuga Eppendorf 5415R) utilizando-se micro tubos (Amicon Ultra de 0,5 mL com membrana de

10K da Millipore). A centrifugação ocorreu em duas etapas: primeiro para recuperar o material filtrado (15 minutos / 14000g / 4°C), no qual se espera coletar parte da solução tampão e moléculas de nisina livre que não aderiram à superfície das moléculas de amido e depois para reaver o material retido (2 minutos / 1000g / 4°C), no qual se pretende recuperar as moléculas de amido nativo e nanoamido sonicado com microesferas.

A atividade antimicrobiana foi detectada através do teste de difusão em Agar (MOTTA; BRANDELLI, 2002).

A solução de nisina (preparada de acordo com o item 4.11.2) e as duas soluções contendo o material filtrado foram filtradas (filtro estéril com membrana de 0,22 µm) e as soluções que continham o material retido ficaram expostas à luz UV por 40 minutos. A inoculação da solução de nisina em placas com ágar BHI foi realizada com o intuito de verificar se o bactericida utilizado apresentava atividade.

Nesta etapa foram testadas as cinco amostras descritas acima, em triplicata. Em uma placa de diluição, adicionou-se 100 µL da amostra e 100 µL do tampão de acetato de sódio, os quais foram homogeneizados. Após, pipetou-se 100 µL dessa mistura para a diluição seguinte e homogeneizou-se novamente. Esse procedimento foi repetido até a diluição de 6400 UA mL⁻¹. Encerrada a etapa de diluição, uma alíquota de 10µL de cada amostra foi aplicada em placas de ágar BHI previamente inoculadas com um swab submerso em uma suspensão do microrganismo indicador (*L. monocytogenes* ATCC 7644), correspondendo a um padrão de turvação de 0,5 na Escala McFarland (aproximadamente 10⁷ UFC mL⁻¹). Cabe observar que a primeira alíquota adicionada à placa continha apenas a amostra, sem nenhuma diluição. Esse procedimento foi repetido com as mesmas amostras, as quais ficaram armazenadas em geladeira (4-5°C) durante 7 dias, para verificar se haveria influência na atividade.

As placas foram incubadas a 37°C e mantidas em geladeira (4-5°C) durante 21 dias, sendo que a cada três dias, os halos de inibição do crescimento da *L. monocytogenes* foram medidos. O valor proveniente da maior diluição que produzir uma zona de inibição será tomado como unidade de atividade (UA) por mL (MOTTA e BRANDELLI, 2002).

4.11.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As análises foram feitas em triplicata e as respectivas avaliações estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.3 para comparação das médias (Teste de Tukey).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E MODIFICAÇÃO DO AMIDO

O índice de aproveitamento das sementes de pinhão foi calculado utilizando-se a equação 2 abaixo:

$$\text{Índice de aproveitamento da semente (\%)} = \frac{\text{massa do pinhão sem casca (g)} * 100}{\text{massa do pinhão com casca (g)}} \quad (2)$$

O índice resultante foi de 54,83%, devido à grande quantidade de sementes em estado de deterioração (presença de fungos, larvas e sementes brotadas), as quais foram descartadas. Este percentual é baixo quando comparado com os resultados encontrados por Thys (2009) e Bello-Pérez et al. (2006), que foram 77% e 78%, respectivamente.

O rendimento do processo de extração do amido do pinhão foi calculado através da seguinte equação 3:

$$\text{rendimento do amido de pinhão (\%)} = \frac{\text{massa de amido seco após extração (g)} * 100}{\text{massa de pinhão sem casca (g)}} \quad (3)$$

A extração do amido de pinhão nativo também apresentou um rendimento abaixo do relatado na literatura devido à adesão do pó na parede da câmara de secagem e na tubulação do equipamento, totalizando um rendimento de 20,4%, resultado semelhante ao obtido por Silva (2011), que foi de $19,36 \pm 0,26\%$, apesar deste ter realizado secagem em estufa.

Estudos anteriores relatam rendimentos diversos: Henríquez et al. (2008) conseguiram rendimento de 36% (secagem em estufa a 60°C por 1 hora após filtração à vácuo), Thys (2009) encontrou 42,97% (secagem realizada em estufa a 40°C por 3 dias), enquanto Bello_Pérez et al. (2006) obtiveram um rendimento de aproximadamente 70% (secagem em estufa a 37°C por 24 horas). Sugere-se que este valor mais alto deve-se ao processo de secagem, pois na estufa não há adesão do pó no equipamento, como ocorreu no presente estudo. Porém, o rendimento obtido nesse trabalho é semelhante a amidos de diferentes fontes botânicas, como a mandioca (25,5%), a batata-doce (18,3%) (LEONEL et al., 1998), milho (24,83%) (CARDOSO et al., 2011), batata inglesa (18%) e inhame (18-23%) (FRANCO et al., 2002).

A metodologia de hidrólise ácida apresentou um rendimento de 34,54%, o qual foi calculado com base na equação 4 a seguir:

$$\text{rendimento da hidrólise ácida (\%)} = \frac{\text{massa de amido seco após hidrólise ácida (g)} * 100}{\text{massa de amido nativo (g)}} \quad (4)$$

O baixo rendimento deve-se, provavelmente, a dois fatores: durante a hidrólise ocorreu a lise das ligações glicosídicas, as quais liberaram açúcares solúveis, que foram descartados durante as lavagens feitas com água no final do tratamento a fim de interromper o processo de hidrólise; e também ocorreu a perda de amostra durante a secagem em *spray dryer*, a qual ficou retida nas paredes da câmara de secagem e na tubulação do equipamento. Albanus (2009) relatou rendimento de aproximadamente 52%, porém a referida autora realizou secagem em estufa.

No cálculo do rendimento do amido modificado por ondas ultrassônicas também se utilizou a equação 4 e obteve-se 64,92%. Este valor deve-se a perda de amostra durante a atomização.

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Foram realizadas as análises de umidade, atividade de água, lipídeos, proteínas, amido, amilose, fibra bruta, cinzas, açúcares redutores e colorimetria nas amostras em pó de amido nativo e os modificados por hidrólise ácida e ultrassom.

De acordo com Thomas e Atwell (1999), citado por Adedokun e Itiola (2010), a umidade em pós de amido normalmente atinge o equilíbrio a aproximadamente 12% ou menos. No presente trabalho, a umidade das três amostras atingiu valores próximos a 7,4% e não apresentou diferença significativa entre eles, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Umidade e atividade de água das amostras de amido de pinhão nativo e modificado

Amostra	UMIDADE (g/100g)	ATIVIDADE DE ÁGUA
AMIDO NATIVO	7,52 ^a ± 0,11	0,26 ^a ± 0,006
HIDRÓLISE ÁCIDA	7,29 ^a ± 0,02	0,29 ^a ± 0,025
ULTRASSOM	7,39 ^a ± 0,26	0,24 ^a ± 0,001

*média de três repetições ± desvio padrão. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Henríquez et al. (2008) reportaram umidade do amido de pinhão de $10,84 \pm 0,03\%$, obtido mediante secagem em estufa a 60°C por 1 hora, Capella et al. (2009) de $8,29 \pm 0,29\%$ em amido seco com circulação de ar forçada a 65°C , Silva (2011) de $10,40 \pm 0,21\%$ em estufa a 40°C por 24 horas, Daudt (2012) encontrou valores próximos a 7% em estufa a 40°C por aproximadamente 48 horas e Spada (2011) de $6,23 \pm 2,09\%$ na forma de microcápsulas liofilizadas. Dessa forma, pode-se verificar que os resultados obtidos no presente trabalho estão dentro do esperado e que a umidade das amostras depende do tipo de secagem ao qual o amido de pinhão é submetido.

A Tabela 4 mostra os valores de atividade de água encontrados neste trabalho. De acordo com os resultados acima, percebe-se que eles se encontram na faixa correspondente à maior estabilidade dos alimentos, isto é, no intervalo de atividade de água que vai de 0,2 a 0,4 (JAY, 2005). Os valores de a_w atingidos nesse trabalho para o amido nativo e os dois tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. Cladera-Olivera (2008) reportou atividade de água de $0,305 \pm 0,03$ para farinha de pinhão desidratada em ar quente a 70°C .

O teor de lipídeos e de proteínas que cada uma das amostras contém pode ser observado na Tabela 5:

Tabela 5. Teor de lipídeos e proteína das amostras de amido de pinhão nativo e modificado

	TEOR DE LIPÍDEOS* (g/100g)	TEOR DE PROTEÍNAS* (%)
AMIDO NATIVO	$0,513^a \pm 0,025$	$0,363^a \pm 0,040$
HIDRÓLISE ÁCIDA	$0,487^a \pm 0,021$	$0,333^a \pm 0,110$
ULTRASSOM	$0,497^a \pm 0,035$	$0,364^a \pm 0,056$

(%bu)

*média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O teor de lipídeos nas amostras de amido extraído de pinhão sofreu uma considerável redução quando comparado à semente de pinhão de cru. Cladera-Olivera et al. (2008), relataram $1,24 \pm 0,09\%$ para esta (resultado semelhante ao de Cordenusi et al. (2004), que encontraram $1,26 \pm 0,07\%$), o que resulta numa redução de aproximadamente 60 % quando comparado aos resultados apresentados na Tabela 5. Essa diminuição deve-se a remoção de lipídeos durante o processo de extração do amido, conforme foi relatado por Buléon et al. (1998).

As três amostras apresentaram valores semelhantes aos relatados por Thys (2009). A referida autora encontrou $0,47 \pm 0,07\%$ para o teor de lipídeos na extração do amido em água. Dentre as amostras analisadas nesse trabalho, não houve diferença significativa, isto é, a redução no teor de lipídeos ocorreu apenas durante o processo de extração do amido.

Conforme pode ser observado na Tabela 5, o teor de proteína nas três amostras (amido de pinhão nativo e modificado) não apresentou diferença significativa, o que confirma o que foi dito por Buléon et al. (1998). De acordo com esses autores, lipídios, proteínas, enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos são os componentes removíveis pelos procedimentos de extração do amido.

O teor de proteína relatado por diversos autores difere um pouco dos resultados expressos na Tabela 5. O teor de proteína do amido extraído foi reduzido quando comparado à semente crua. Henríquez et al. (2008) encontraram teor de proteína da semente crua de $7,81 \pm 0,35\%$ em base seca (aproximadamente $7,24\%$ em base úmida), enquanto Cordenusi et al. (2004) obtiveram $3,57 \pm 0,05\%$ em base úmida, Cladera-Olivera et al. (2008) relataram o percentual de $2,97 \pm 0,05\%$ em base úmida e Capella et al. (2009) determinaram o teor de $3,07 \pm 0,06\%$ em base seca (aproximadamente $2,97\%$ em base úmida). O teor de proteína do amido extraído das sementes de pinhão encontrado nesse trabalho foi de aproximadamente $0,353\%$ (conforme Tabela 5), valor semelhante ao obtido por Thys (2009) que foi de $0,35 \pm 0,4\%$. Estes valores, porém, diferem do encontrado por Henríquez et al. (2008), que foi de $0,94 \pm 0,10\%$. Estas diferenças podem ser justificadas pelo tipo de solo, condições de crescimento, estágio de maturação ou condições pós-colheita.

Os conteúdos de amido e amilose presentes nas amostras estão disponíveis na Tabela 6:

Tabela 6. Teor de amido e amilose nas amostras de amido de pinhão nativo e modificado

	TEOR DE AMIDO* (%)	TEOR DE AMILOSE* (%)
AMIDO NATIVO	$78,09^{a} \pm 0,265$	$20,72^{a} \pm 0,211$
HIDRÓLISE ÁCIDA	$67,03^{c} \pm 0,259$	$5,52^{b} \pm 0,784$
ULTRASSOM	$72,63^{b} \pm 0,305$	$23,05^{a} \pm 0,567$

(%bs)

*média de três repetições \pm desvio padrão. ^{a,b,c}Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os teores de amido encontrados na literatura também diferem entre si, fato que pode ser explicado devido aos diferentes métodos de determinação do amido, assim como ao cultivo das sementes em diferentes regiões do país e o uso de diferentes espécies. Na análise da semente crua, Cordenusi et al. (2004) encontraram $36,28 \pm 0,11\%$ em base úmida, que corresponde a aproximadamente $56,94\%$ em base seca, Henríquez et al. (2008) obtiveram o valor de $63,67 \pm 2,55\%$ em base seca e a análise de Cladera-Olivera et al. (2008) resultou em $35,5 \pm 0,2\%$ em base úmida (aproximadamente $55,04\%$ em base seca).

Em relação ao teor de amido, após o processo de extração, também ocorre diferença nos valores obtidos pelos autores acima reportados, o que indica maior ou menor grau de pureza da amostra. Dentre os pesquisadores, Daudt (2012) obteve o maior teor de amido, resultando em $94,53 \pm 0,13\%$ em base seca, seguido de Bello Pérez que encontrou aproximadamente 86% . Henríquez et al. (2008) relataram que a amostra continha $77,17 \pm 1,01\%$, valor mais próximo ao atingido nesse trabalho para as amostras de amido nativo, conforme pode ser visto na tabela 6. Thys et al. (2010) determinaram um teor de $69,13 \pm 0,22\%$, semelhante aos valores encontrados nos amidos modificados por hidrólise ácida e ondas ultrassônicas.

Com base na tabela anterior, verifica-se que houve diferença significativa entre as amostras analisadas. Tal fato pode ser explicado devido a reações de hidrólise ocorridas durante o processo, o que resultaria na liberação de moléculas de menor tamanho, as quais se solubilizariam em água e, portanto, seriam descartadas juntamente com o sobrenadante durante a centrifugação das amostras.

O teor de amilose verificado em cada uma das amostras pode ser observado na Tabela 6. Em relação ao teor de amilose presente nas amostras, pode-se afirmar que os valores obtidos no presente trabalho para o amido nativo ($20,717 \pm 0,2113$) e para o amido modificado por ondas ultrassônicas ($23,052 \pm 0,5667$) são semelhantes à maioria dos resultados encontrados na literatura, diferindo drasticamente apenas de Henríquez et al. (2008), que conseguiram $42,1 \pm 2,58\%$ de amilose, os quais relataram que essa diferença poderia ser explicada pelo uso de diferentes espécies de *Araucaria*, como a *Araucaria araucana* (variedade presente no Chile) que foi utilizada no trabalho citado. Wosiacki e Cereda (1985), Bello Pérez et al. (2006), Stahl et al. (2007), Thys (2009) encontraram $22,25\%$, $25 \pm 0,6\%$, $23,54 \pm 1,74\%$ e $26,3 \pm 0,7\%$, respectivamente.

Amidos provenientes de outras fontes botânicas apresentam conteúdo de amilose semelhante aos resultados obtidos nesse estudo. Milho, banana e trigo possuem 15, 21 e 24 % de amilose, respectivamente (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Os teores de amilose presentes nas amostras de amido nativo e amido modificado por ultrassom não apresentaram diferença significativa entre si. Entretanto, o conteúdo de amilose presente nos amidos que sofreram o processo de hidrólise ácida teve uma grande redução. Esta diminuição pode ser atribuída ao fato que a reação de hidrólise inicia-se na região amorfa do grânulo, na qual se situa a amilose (FRENCH, 1973; JAYAKODY; HOOVER, 2002), e ao longo tempo de reação (50 dias) a que esse amido foi exposto, o que poderia justificar, portanto, um valor tão baixo.

Quanto ao teor de fibra bruta presente nas amostras pode ser visualizado na Tabela 7:

Tabela 7. Teor de Fibra Bruta nas amostras de amido de pinhão nativo e modificado

	TEOR DE FIBRA BRUTA* (%)
AMIDO NATIVO	0,14 ^a ± 0,036
HIDRÓLISE ÁCIDA	0,12 ^a ± 0,01
ULTRASSOM	0,11 ^a ± 0,02

(%bs)

*média de três repetições ± desvio padrão. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O teor de fibra bruta pode diferir devido à origem da semente e a metodologia aplicada na extração. Em relação ao teor de fibra bruta presente na semente de pinhão crua, houve uma redução significativa quando comparado à quantidade apresentada nos amidos de pinhão nativo e modificados. Cladera-Olivera et al. (2008) encontraram valores de $1,5 \pm 0,1\%$ para a semente de pinhão crua, enquanto nesse trabalho obteve-se aproximadamente $0,14 \pm 0,036\%$, em base seca, para os amidos extraídos, o que representa uma queda de aproximadamente 90%. Esta diminuição no conteúdo de fibra bruta deve-se a sua retenção nas peneiras durante o processo de extração. Stahl et al. (2007) e Thys (2009) encontraram valores de $0,86 \pm 0,40\%$ em base seca ($\sim 0,85\%$ em base úmida) e $0,39 \pm 0,00\%$ em base seca ($\sim 0,388\%$ em base úmida), respectivamente para o amido de pinhão. A diferença apresentada entre o presente trabalho e o valor obtido por Thys (2009) deve-se unicamente à origem da semente e à safra, uma vez que se utilizou o mesmo protocolo de extração.

Dentre as amostras analisadas neste trabalho não houve diferença significativa, pois conforme foi dito acima, a maioria das fibras ficaram retidas nas peneiras de 60 e 200 *mesh*.

O teor de cinzas das amostras pode ser verificado na Tabela 8:

Tabela 8. Teor de cinzas nas amostras de amido de pinhão nativo e modificado

	TEOR DE CINZAS (%)
AMIDO NATIVO	0,0007 ^a ± 0,0005
HIDRÓLISE ÁCIDA	0,0006 ^a ± 0,0004
ULTRASSOM	0,0006 ^a ± 0,0002

(%bu)

*média de três repetições ± desvio padrão. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O teor de cinzas presente no amido de pinhão é bastante baixo quando comparado à sua semente crua. Cordenusi et al. (2004) e Cladera-Olivera et al. (2008) encontraram conteúdo de resíduo inorgânico semelhantes em semente crua de pinhão, respectivamente de $1,6 \pm 0,01\%$ e $1,15 \pm 0,05\%$, o que resulta em uma perda de aproximadamente 100% em relação aos valores obtidos para o amido de pinhão nesse trabalho.

Os valores encontrados neste trabalho são menores quando comparados aos da literatura. Stahl et al. (2007) e Thys (2009) encontraram valores semelhantes, respectivamente de $0,32 \pm 0,09\%$ e $0,44$. As análises realizadas por Bello Pérez et al. (2006) resultaram em aproximadamente $0,04\%$. Essas diferenças também podem ser explicadas pela origem e safra dos pinhões, assim como pela metodologia utilizada na extração do amido.

Como pode ser observado na tabela 8, as três amostras não diferiram significativamente entre si, indicando que os resíduos minerais foram eliminados durante o processo de extração.

As análises realizadas neste trabalho a fim de avaliar o teor de açúcares redutores resultaram apenas em traços, resultado igual ao obtido por Bello Pérez et al. (2006) e semelhante ao encontrado por Henríquez et al. (2008), os quais determinaram traços de açúcares totais e $0,03 \pm 0,01 \%$ de açúcares redutores. Segundo estes mesmos pesquisadores, o teor de açúcar total presente na semente de pinhão crua é de $7,10 \pm 0,002$ e os redutores representam $0,59 \pm 0,01$. Sugere-se que a eliminação desse componente deva ter ocorrido juntamente com o processo de extração do amido, o qual teria sido descartado com o sobrenadante.

Os três padrões colorimétricos das amostras (L^* , a^* e b^*) das três amostras analisadas podem ser vistas na Tabela 9:

Tabela 9. Análise Colorimétrica das amostras de amido de pinhão nativo e modificado

	L^*	a^*	b^*
AMIDO NATIVO	95,48 ^a ± 0,150	-0,08 ^c ± 0,011	1,54 ^b ± 0,010
HIDRÓLISE ÁCIDA	94,98 ^b ± 0,006	0,27 ^a ± 0,025	1,77 ^a ± 0,062
ULTRASSOM	94,69 ^c ± 0,072	0,14 ^b ± 0,020	1,22 ^c ± 0,010

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b,c}Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

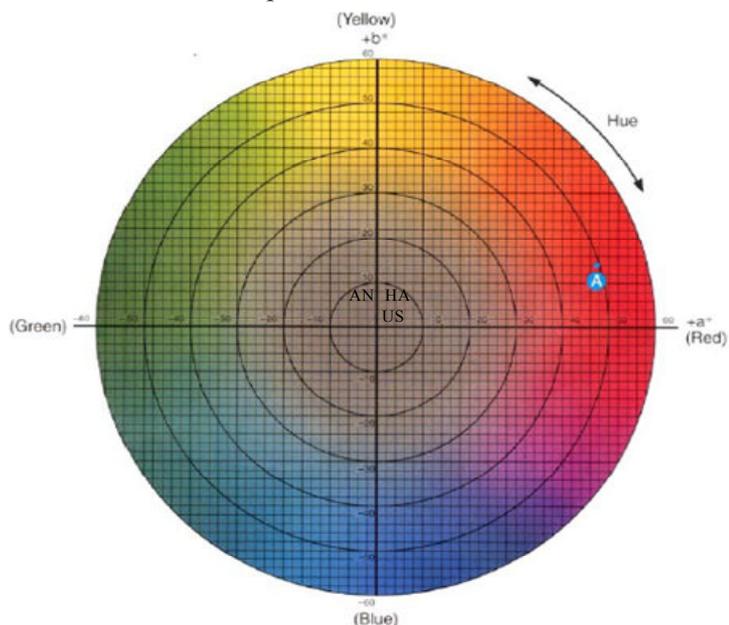
A colorimetria das amostras apresentou valores com diferença significativa entre todos os parâmetros analisados, embora essa diferença possa ser considerada pequena quando se leva em consideração o grande intervalo utilizado nesses parâmetros (conforme pode ser observado na Tabela 9). O valor de luminosidade das três amostras analisadas aproximou-se do branco, conclusão semelhante à de Henríquez et al. (2008) e Daudt (2012) para amido de pinhão nativo, que obtiveram L^* de $92,03 \pm 0,37$ e $93,22 \pm 0,01$, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada pelo tipo de secagem empregada. Daudt (2012) realizou secagem em estufa, fazendo com que o amido extraído ficasse longo tempo (aproximadamente 48 horas) exposto ao calor (40°C), o que pode ter originado amostra um pouco mais escura do que a obtida neste estudo. Em relação à farinha de pinhão cru seca a 85°C, para a qual Cladera-Olivera (2008) encontrou L^* igual a $88,18 \pm 0,01$, pode-se afirmar que houve um clareamento da amostra. Isto pode ser explicado devido à eliminação de grande parte dos outros componentes constituintes, como proteína, fibras, açúcares, da semente durante o processo de extração.

Pode-se considerar que parâmetro de cor a^* obtido nesta pesquisa foi próximo de $0,77 \pm 0,07$ e $0,40 \pm 0,01$, valores relatados por Henríquez et al. (2008) e Daudt (2012), respectivamente, para amido nativo de pinhão, visto que este varia de -80 a +100. Quando comparado à farinha de pinhão cru seca a 85°C, que apresentou a^* igual a $2,21 \pm 0,03$ (CLADERA-OLIVERA, 2008), pode-se dizer que houve uma pequena diminuição da intensidade da cor vermelha.

Por fim, o parâmetro de cor b^* foi o que mais diferiu dos resultados obtidos por Henríquez et al. (2008) e Daudt (2012) para amido de pinhão nativo, passando de $4,68 \pm 0,72$ e $3,62 \pm 0,01$, respectivamente, para aproximadamente 1,5, resultando em uma cor parecida à do parâmetro a^* , conforme pode se verificar no diagrama de cromaticidade (Figura 5), onde estão representados, aproximadamente, as amostras de amido nativo (AN) e os modificados por hidrólise ácida (HA) e por ultrassom (US).

Apesar das amostras apresentarem diferença significativa entre si pelo teste de Tukey, visualmente esta diferença não foi perceptível, como pode ser observado no diagrama de cromaticidade dos parâmetros a^* e b^* , no qual foram marcados a localização aproximada de cada amostra (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama de cromaticidade parâmetros a^* e b^* . AN, amido nativo; HA, amido modificado por hidrólise ácida; US, amido modificado por ultrassom.



Fonte: MINOLTA (1998)

5.3 SOLUBILIDADE

A solubilidade média das amostras a 20°C pode ser verificada na Tabela 10:

Tabela 10. Solubilidade média das amostras

	SOLUBILIDADE MÉDIA* (%)
AMIDO NATIVO	3,27 ^a ± 0,58
HIDRÓLISE ÁCIDA	16,90 ^b ± 0,95
ULTRASSOM	1,43 ^a ± 0,25

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b}Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A solubilidade do amido nativo a 20 °C obtida nesse estudo aproximou-se mais daquela encontrada por Spada (2011), que foi de 4,28 ± 0,24%. Entretanto, Thys encontrou

índice de solubilidade, a 25°C, de $0,31 \pm 0,04\%$, resultado semelhante ao relatado por Henríquez et al. (2008), que foi de $0,27 \pm 0,01\%$, a 30°C e por Daudt (2012), a qual obteve 0,03% a 25°C. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diversas origens das sementes, pela metodologia aplicada e, também, pelo modo de secagem que autores empregaram.

Os três últimos pesquisadores citados, que atingiram menores índices de solubilidade, utilizaram metodologias semelhantes, nas quais as amostras foram mantidas em banho termostático por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Além disso, realizaram secagem em estufa convencional, utilizando diferentes tempos e temperaturas, porém, sempre superiores a 24 horas de exposição, o que pode ter ocasionado danos à estrutura.

Spada (2011) baseou-se na mesma metodologia utilizada nesse trabalho, na qual a solução permaneceu sob agitação por 30 minutos antes de ser centrifugada. Esta autora realizou a secagem através da técnica de liofilização, a qual minimiza as alterações que normalmente ocorrem durante a secagem devido ao uso de temperaturas mais altas e ao longo tempo de exposição a este calor. Este binômio tempo-temperatura também pode explicar o resultado obtido nesse trabalho, pois, apesar de usar temperaturas altas, o tempo de contato da amostra com o calor é muito pequeno, não permitindo, assim, que ocorram rompimentos e distorções em sua estrutura enquanto estão diminuindo seu teor de umidade.

O alto índice de solubilidade encontrado nas moléculas de amido que foram submetidas ao processo de hidrólise ácida, deve-se, de acordo com Loksuwan (2007) ao aumento do grau de hidrólise, que implica no aumento significativo da solubilidade das amostras devido às diferenças na estrutura e composição dos amidos. Segundo esse autor, o amido ácido modificado possui uma maior quantidade de compostos de menor massa molar resultante da depolimerização do amido nativo durante a hidrólise ácida, aumentando, dessa maneira, a solubilidade do pó. Chang, Lin e Pan (2010) também constataram em seus estudos sobre amido de arroz que a solubilidade dos amidos tratados com ácido também foi maior do que a do amido nativo. Lawal e Adebowale (2005) e Singh et al. (2009) verificaram aumento da solubilidade das amostras de uma variedade de feijão e de um tipo de “castanha aquática”, respectivamente, em relação ao amido nativo dessas matérias-primas quando submetidas à hidrólise ácida, utilizando-se ácido clorídrico.

A solubilidade das moléculas de amido que passaram pelo processo de ondas ultrassônicas não apresentou diferença significativa em relação às moléculas de amido de

pinhão nativo. Apesar de apresentarem um valor inferior, mesmo possuindo conteúdo de amilose (que apresenta relação direta com solubilidade das moléculas) semelhante, sugere-se que possa ter havido, durante o processamento, a conglomeração das moléculas de amilose devido às forças cavitacionais, diminuindo, assim, a solubilidade da amostra em relação aquela que não sofreu nenhum tipo de tratamento, conclusão também observada por Izidoro (2011).

5.4 SINÉRESE

A sinérese das amostras armazenadas a 4°C durante 24h, 48h, 72h e 120h pode ser analisada na Tabela 11:

Tabela 11. Sinérese média das amostras das amostras de pinhão nativo de amido modificado

SINÉRESE MÉDIA (%)*				
Tempo (h)	24 h*	48 h*	72 h*	120 h*
AMIDO NATIVO	75,72 ± 0,99 ^{Ba}	77,20 ± 0,23 ^{Ba}	78,32 ± 0,13 ^{Cab}	78,48 ± 0,32 ^{Cb}
HIDRÓLISE ÁCIDA	93,82 ± 0,24 ^{Aa}	94,04 ± 0,22 ^{Ab}	94,57 ± 0,14 ^{Ab}	97,69 ± 0,35 ^{Ac}
ULTRASSOM	77,20 ± 0,32 ^{Ba}	77,62 ± 0,33 ^{Ba}	79,59 ± 0,23 ^{Bb}	80,83 ± 0,37 ^{Bb}

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b,c}Letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{A,B,C}Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A sinérese do amido nativo de pinhão não apresentou diferença significativa durante as primeiras 48 horas e os valores obtidos depois de transcorridas 72 e 120 horas de armazenamento a 4°C também não diferiram entre si, conforme pode ser observado na tabela 11. Thys (2009) encontrou resultados diferentes para o amido de pinhão, determinando uma taxa de água exsudada de 14% após 28 dias de armazenamento a 5°C, resultado parecido ao de Stahl et al. (2007), que, nas mesmas condições, encontraram uma porcentagem de 17%. Esta grande diferença deve-se, principalmente, pelas diferentes metodologias aplicadas, enquanto a referida autora apenas verteu a amostra para retirar a água exsudada, neste trabalho, o teor de água liberada foi medido através da centrifugação do material, o que resulta na liberação de maior quantidade de água.

Izidoro (2011) analisou amido de banana verde submetido à secagem em *spray dryer* e obteve os seguintes resultados: em 24 horas, $64,39 \pm 1,04\%$; 48 horas, $75,22 \pm 1,63\%$; 72 horas, $70,31 \pm 0,15\%$ e, em 120 horas, $74,73 \pm 0,80\%$. Os valores podem ter diferido devido às diferentes fontes botânicas das quais o amido foi extraído, pois o protocolo de análise seguido foi mesmo.

Sugere-se que a sinérese dos amidos ácidos modificados possa ter apresentado valores maiores de água exsudada devido ao alto tempo de exposição das amostras em solução durante o tratamento (50 dias em solução ácida), o que pode ter originado uma rede tridimensional com moléculas de amilose e amilopectina curtas, gerando uma estrutura mais frágil e com isso menor quantidade de pontos nos quais as moléculas de água poderiam ligar-se. Esta teoria também vai ao encontro da exposta na análise de solubilidade, expressa no item 5.3.

De acordo com Sandhu et al. (2008), a degradação ácida envolve principalmente a hidrólise das moléculas de amido em fragmentos de baixo peso molecular, o que implica no aumento do número de moléculas lineares menores que as moléculas de amilose do amido nativo, alterando suas propriedades físico-químicas, porém sem alterar a estrutura cristalina do grânulo.

O percentual de água exsudada da amostra sonicada diferiu significativamente após transcorridas 72 horas de armazenamento, e manteve-se sem apresentar diferença significativa em 120 horas, como pode ser visto na Tabela 11. Quando comparado ao amido de banana verde, submetido a tratamento de ultrassom e seco em atomizador, analisado por Izidoro (2011), pode-se verificar que os resultados apresentaram valores distintos: em 24 horas, $64,43 \pm 1,22\%$; 48 horas, $71,31 \pm 0,30\%$; 72 horas, $67,05 \pm 0,26\%$ e, em 120 horas, $71,13 \pm 1,51\%$. Diferença semelhante aquela verificada na análise do amido nativo, que, também, pode ser explicada por se tratar de amidos provenientes de diferentes fontes botânicas.

Ao comparar os diferentes tratamentos com o amido nativo de pinhão, pode-se verificar que o amido nativo e o sonicado não diferiram significativamente até 48 horas de armazenamento e, após, apesar de apresentarem diferença pelo teste de Tukey, os valores não diferiram muito entre si. Porém, a amostra modificada por hidrólise ácida diferiu significativamente do tratamento por ondas ultrassônicas e do amido nativo de pinhão, devido

à possível ocorrência de lise das ligações durante o processamento e, com isso, a alteração no comprimento das moléculas.

5.5 HIGROSCOPICIDADE

A higroscopicidade das amostras, mantidas a 25°C em um recipiente com solução de NaCl, se apresenta na Tabela 12:

Tabela 12. Higroscopicidade das amostras de amido de pinhão nativo de amido modificado

	HIGROSCOPICIDADE (g H ₂ O/100g s.s.)
AMIDO NATIVO	32,90 ^a ± 0,603
HIDRÓLISE ÁCIDA	39,62 ^b ± 1,054
ULTRASSOM	35,82 ^a ± 0,154

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b}Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Como pode ser observado na tabela, as amostras de amido nativo e ultrassom não diferiram significativamente entre si. Este valor é semelhante ao encontrado por Nunes et al. (2009) para o amido de inhame, que foi de 31,855. Ferreira e Pena (2003) reportaram valores de higroscopicidade da farinha de pupunha (que contém 64,7 gramas de carboidratos/100 gramas de produto) de 50,30 a temperatura de 15°C e de 43,80 à temperatura de 35°C. Esta diferença é explicada por Mazza e LeMaguer (1980), pois segundo os autores, o amido torna-se menos higroscópico com o aumento da temperatura devido a redução do número de grupos hidroxila disponíveis para ligações com a molécula de água, através de pontes de hidrogênio, como resultado de mudanças químicas e/ou físicas no produto geradas pela temperatura.

Sugere-se que a semelhança dos valores de higroscopicidade das moléculas de amido nativo de pinhão e as modificadas por ondas ultrassônicas deve-se a baixa frequência (20 KHz) aplicada nas amostras. Segundo Ashokkumar et al. (2008) há influência entre a frequência do ultra-som e o rendimento da produção de radicais livres. Na frequência de 20 KHz, as bolhas de cavitação são transitórias, o que implica menor quantidade de bolhas ativas e, conseqüentemente, o OH• gerado é mínimo.

Apenas a amostra de hidrólise ácida diferiu significativamente, apresentando valores superiores, o que pode ser explicado devido às hidrólises ocorridas nas ligações glicosídicas,

originando moléculas de menor comprimento, como dissacarídeos e monossacarídeos, as quais são mais higroscópicas que as de polissacarídeos devido ao maior número de hidroxilas livres (WHISTLER; DANIEL, 1990).

5.6 CLARIDADE DA PASTA

A claridade de pasta dos amidos nativo e modificados foi calculada como percentual de transmitância (%), medidos com absorbância de 540 nm. Os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 13.

Tabela 13. Claridade da pasta das amostras de amido de pinhão nativo e amido modificado

	TRANSMITÂNCIA (%T)			
	Tempo de armazenamento (h)			
	24 h	48 h	72 h	120h
AMIDO NATIVO	46,67 ± 0,0005 ^{Aa}	24,83 ± 0,0138 ^{Ab}	20,62 ± 0,0298 ^{Bc}	14,33 ± 0,0038 ^{Bd}
HIDRÓLISE ÁCIDA	91,94 ± 0,0003 ^{Ba}	80,02 ± 0,0010 ^{Ab}	77,40 ± 0,0004 ^{Ac}	59,40 ± 0,0032 ^{Ad}
ULTRASSOM	85,36 ± 0,0004 ^{Ba}	65,40 ± 0,0007 ^{Ab}	33,51 ± 0,0184 ^{Cc}	12,05 ± 0,0341 ^{Bd}

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b,c}Letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{A,B,C}Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O percentual de transmitância dos géis de amido diminuiu significativamente com tempo de estocagem das amostras, mantidas a 4°C. Vários autores também observaram essa diminuição ao analisar amidos de diferentes fontes botânicas: Singh, Sandhu e Kaur (2004) e Oliveira et al. (2009) analisaram o amido do grão de bico após 4 dias de armazenamento, Yamani (2010) ao estudar amidos de oca, olluco e mashua e Izidoro (2011) ao observar o amido de banana verde. Segundo esses autores, essa queda de claridade pode ter relação com o rearranjo das moléculas de amilose e amilopectina, o que ocasionaria maior absorção da luz.

Os resultados expressos na Tabela 13 mostram que a claridade da pasta inicial (24 horas) das amostras dos amidos modificados foi maior quando comparado ao nativo. Matsuguma (2006) analisou mandioquinha-salsa e encontrou diferentes valores de transmitância para os amidos nativos e modificados, sendo que estes últimos apresentaram pastas muito mais translúcidas que aqueles. Segundo este autor, a turbidez diminuiu, em média,

112% em relação ao amido nativo. Esta maior claridade pode ser explicada devido à modificação química. Segundo Craig et al. (1989), as mudanças ocasionadas na estrutura granular e molecular do amido, decorrentes dos tratamentos químicos empregados, poderiam facilitar a penetração e absorção da água nos grânulos, o que favorece um maior intumescimento, resultando em maior transmitância da luz.

A claridade da pasta apresentada pelo amido modificado por hidrólise ácida foi a maior dentre as três amostras, o que pode ser explicado pelo menor teor de amilose presente nesta quando comparada às outras, enquanto que a baixa transmitância dos amidos nativos pode ser explicada pelo alto conteúdo de amilose. De acordo com Takizawa et al. (2004), a solubilidade do amido está relacionada com a claridade da pasta, ou seja, quanto mais solúvel maior transparência de pasta. Essa observação pode ser constatada nesse trabalho, pois as moléculas hidrolisadas na presença de ácido foram as que apresentaram maior solubilidade e maior transparência de pasta. Já os grânulos de amido nativo e os sonicados apresentaram menor solubilidade e pasta com maior turbidez.

O amido submetido a ondas ultrasônicas apresentou claridade de pasta muito superior ao amido nativo de pinhão até 48 horas de armazenamento, apesar de possuírem teores de amilose semelhantes. Segundo Karam (2003), a claridade de pasta pode ser explicada não apenas pelo teor de amilose, mas também pelo menor tamanho das cadeias dessa molécula, característica que sugere uma maior facilidade de alinhamento das cadeias lineares. Porém, após 72 horas de armazenamento a amostra tornou-se mais turva, o que pode ser explicado pela baixa estabilidade e claridade da amilose em solução, o que ocasionou à associação de cadeias lineares através de pontes de hidrogênio (KARAM, 2003).

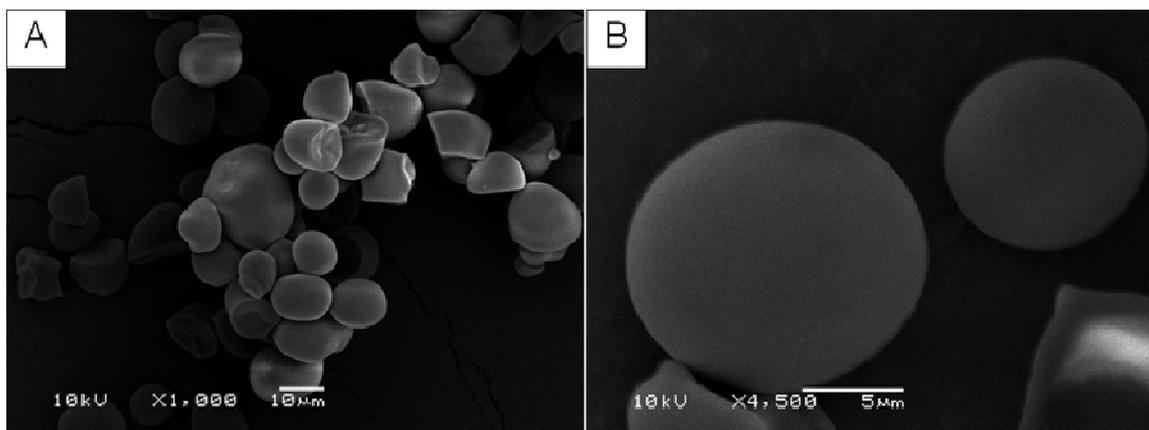
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura, é possível avaliar se houve mudança morfológica nos grânulos de amido nativo e modificados. A figura 6 corresponde ao amido nativo de pinhão com aumentos de 1000 vezes (A) e 4500 vezes (B), a Figura 7 corresponde ao amido de pinhão que teve sua estrutura modificada através de hidrólise ácida com aumento de 1000 vezes (A) e 5000 vezes (B) e, na figura 8 mostra as

imagens obtidas dos amidos de pinhão submetido a ondas ultrassônicas com aproximações de 1000 vezes (A) e 5000 vezes (B).

Como se pode observar, as moléculas de amido nativo apresentaram superfície lisa, sem presença de poros, porém com algumas depressões, as quais, segundo Thies (1995) justificam-se devido à contração das partículas durante a secagem e o resfriamento ocorridos no processo de secagem por atomização. Imagens semelhantes foram apresentadas por outros autores que também trabalharam com amido extraído de pinhão, como Bello Pérez et al. (2006), Thys (2009), Capella et al. (2009), Spada (2011) e Daudt (2012).

Figura 6 - Micrografias dos grânulos de amido nativo de pinhão obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1000x (A) e 4500x (B)



Por sua vez, o amido de pinhão que sofreu o processo de hidrólise ácida apresentou superfície bastante rugosa, com a presença de poros superficiais. Através das imagens pode-se concluir que esse processo de hidrólise não afetou todos os grânulos de maneira uniforme. Enquanto alguns mantiveram superfície lisa, outros (Figura 7B) apresentaram superfície totalmente irregular, o que pode afetar suas propriedades funcionais e físico-químicas.

O amido sonicado apresentou superfície com algumas irregularidades, porém em menor intensidade do que aquelas submetidas à hidrólise ácida. Além disso, pode-se observar que os grânulos expostos a sonicação tendem a se aglomerar, o que confirma a hipótese levantada anteriormente de que as moléculas de amilose teriam se aglomerado durante o processamento, diminuindo, assim, a solubilidade da amostra apesar de possuir conteúdo de amilose semelhante ao amido nativo. Jambrak et al. (2010) explicam essa ocorrência devido à

hidrólise das ligações de hidrogênio, tornando possível conexões e ligações entre os polímeros. Estes pesquisadores também concluíram que ao aumentar a intensidade da aplicação do ultrassom pode ocorrer o rompimento das cadeias de amido, o que pode ter ocorrido neste estudo, pois a frequência utilizada por eles (24 KHz) foi semelhante a utilizada neste (20 KHz).

Neste trabalho, tentou-se obter micrografias com uma aproximação maior a fim de conseguir imagens mais detalhadas dos grânulos de amido modificado em tamanho nanométrico. Porém, com maior aumento, o foco era perdido e as imagens ficavam distorcidas. Entretanto, é visualmente nítida a diferença de tamanho apresentada entre o amido nativo e aqueles que tiveram sua estrutura modificada, quando observadas com aproximação de 1000x (Figuras 6A, 7A e 8A).

Figura 7 - Micrografias dos grânulos de amido de pinhão submetidos à hidrólise ácida obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1000x (A) e 5000x (B)

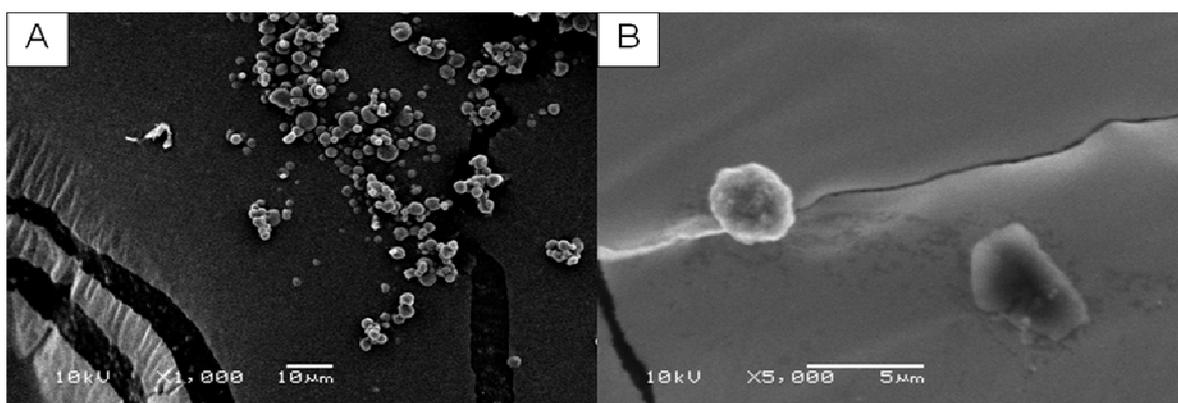
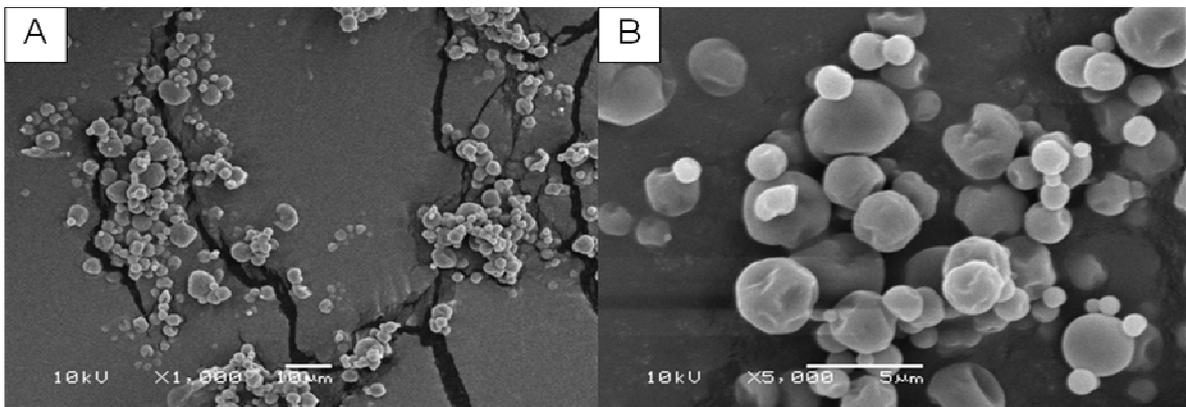


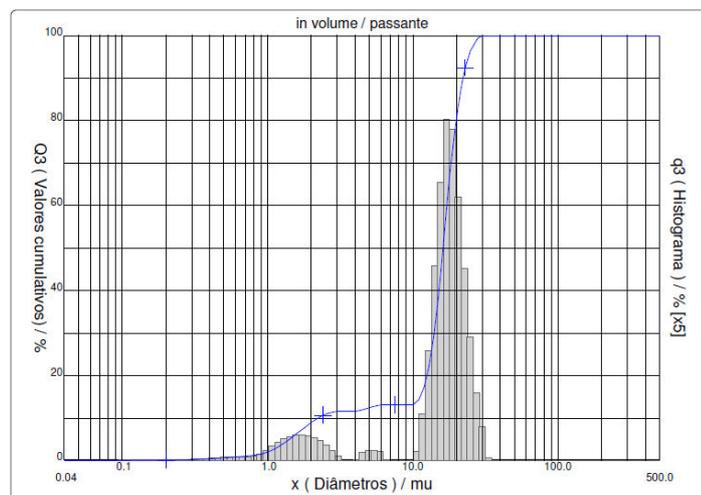
Figura 8 - Micrografias dos grânulos de amido de pinhão submetidos ondas ultrassônicas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1000x (A) e 5000x (B)



5.8 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

O diâmetro médio dos grânulos de amido nativo de pinhão foi de 15,34 μm , valor semelhante ao encontrado por Spada (15,01 \pm 0,03 μm) e que se situa dentro da faixa de diâmetro médio descrita por Bello Pérez et al. (2008), que é de 10 a 25 μm . Thys (2009) também obteve resultados parecidos, atingindo o valor de 7 a 20 μm . A distribuição granulométrica do amido nativo de pinhão, observada neste estudo, pode ser vista na Figura 9. De acordo com a análise, a maior concentração de moléculas de amido situa-se na faixa de 12 a 28 μm .

Figura 9 – Gráfico de distribuição granulométrica do amido nativo de pinhão



5.9 ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS)

Após a aplicação das duas metodologias propostas neste trabalho, ambas resultaram em grânulos nanométricos como pode ser visualizado na Tabela 14, resultantes da análise de espalhamento de luz. O amido ácido modificado apresentou diâmetro médio de 21,8 nm, com polidispersão média de 0,202. Já o amido sonicado resultou em um diâmetro médio de 454,3 nm e polidispersão média de 0,380. Esses valores de polidispersão revelam uma distribuição estreita de tamanho e homogeneidade das nanomoléculas. As amostras diferiram significativamente entre si nos dois pontos analisados, sugerindo que as moléculas hidrolisadas na presença de ácido resultaram em grânulos com tamanhos mais homogêneos. Os valores apresentados representam uma redução de aproximadamente 99,85% e 97% do diâmetro médio da amostra submetida à hidrólise ácida e a ultrassom, respectivamente, quando comparados ao amido nativo de pinhão.

Albanus (2009) obteve no tratamento ácido (igual ao seguido neste trabalho) diâmetros médios que variam de 382,4 nm para a solução ácida (polidispersão de $0,3858 \pm 5,86\%$) a 587,4 nm para a solução tamponada ácida (polidispersão de $0,546 \pm 4,28\%$).

Tabela 14. Diâmetro médio das amostras de amido de pinhão submetido ao tratamento de ondas ultrassônicas (US) e ao tratamento de hidrólise ácida (HA)

	DIÂMETRO MÉDIO* (nm)	POLIDISPERSÃO*
ONDAS ULTRASSÔNICAS	$454,3^a \pm 19,09$	$0,380^a \pm 0,094$
HIDRÓLISE ÁCIDA	$21,8^b \pm 1,08$	$0,202^b \pm 0,054$

*média de três repetições \pm desvio padrão. ^{a,b}Letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

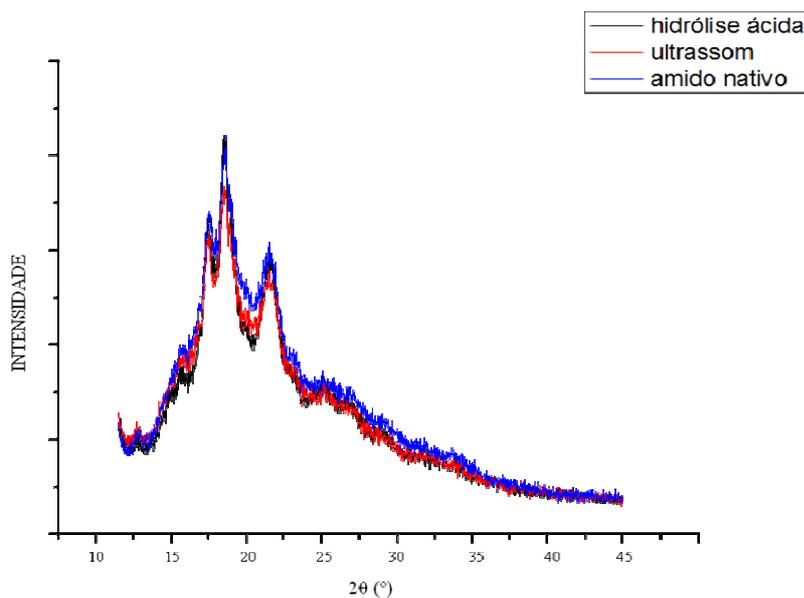
5.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Os diagramas obtidos para as três amostras (amido nativo e os modificados por hidrólise ácida e ondas ultrassônicas) foram muito semelhantes, conforme pode ser visto na Figura 10, sugerindo que os amidos modificados não perderam a cristalinidade e continuam

sendo classificados como tipo C. Segundo Salgado et al. (2005), a inalterabilidade do índice de cristalinidade indica a manutenção de fortes ligações internas das moléculas e maior grau de associação entre as cadeias de amido.

Os diagramas obtidos neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Thys (2009) e Daudt (2012). As amostras analisadas por Thys (2009) apresentaram índice de cristalinidade de $23,3 \pm 0,03\%$ quando o amido foi extraído apenas com água. Daudt (2012) relatou picos de intensidade de refração para ângulos de 2\AA a 15° , 17° , 22° e 23° , sendo esses uma mistura dos espectros de amido do tipo A (picos de intensidade a 2\AA a 15° , 17° , 18° e 23°) e do tipo B (picos de intensidade a 2\AA a $5,6^\circ$, 15° , 17° , 22° e 23°). Esta mistura, segundo Mestres (1996), com predominância do tipo A caracteriza o amido do tipo C, classificação dada ao amido extraído do pinhão.

Figura 10 - Diagrama de difração de raio-X do amido nativo de pinhão e amidos modificados



5.11 INCORPORAÇÃO DE NISINA NO AMIDO DE PINHÃO

5.11.1 MODIFICAÇÃO DA CARGA

A modificação da carga dos grânulos de amido com anidrido succínico foi eficiente, resultado que pode ser observado através da tabela de potencial zeta (Tabela 15) e das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 11).

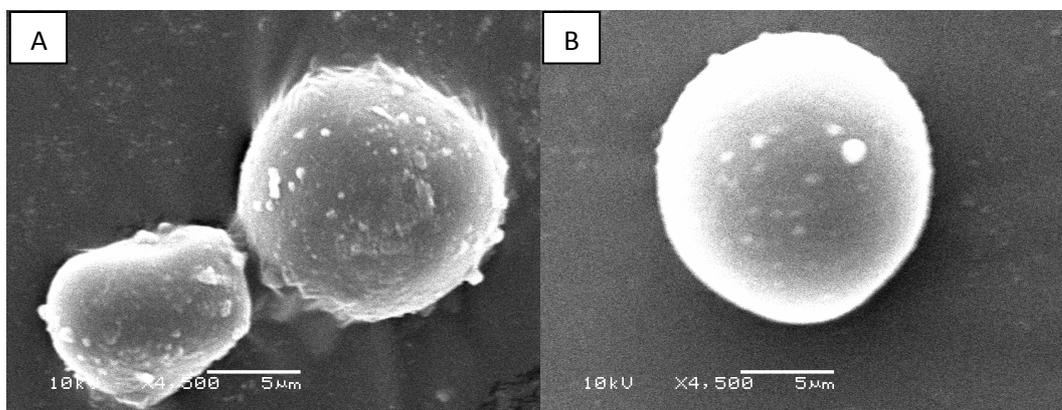
Tabela 15. Potencial Zeta das amostras

	POTENCIAL ZETA* (mV)
AMIDO NATIVO (AN)	-3,24 ^b ±1,75
AMIDO NATIVO + ANIDRIDO SUCCÍNICO (AN + AS)	-16,70 ^c ±0,59
AMIDO MODIFICADO POR ULTRASSOM (US)	-2,91 ^a ±2,61
AMIDO MODIFICADO POR ULTRASSOM + ANIDRIDO SUCCÍNICO (US + AS)	-17,15 ^d ±1,13

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b,c,d}Letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Como pode ser observado na Tabela 15, o potencial eletrostático das amostras adicionadas de anidrido succínico (AN + AS e US + AS) é significativamente mais negativo, o que indica que a adição do anidrido succínico permitiu a incorporação de grupos carboxila, aumentando, assim, a carga negativa das moléculas e possibilitando, segundo Yao (2007), a absorção e estabilização da nisina (carregada positivamente) graças a ligações de baixa energia, tipo eletrostáticas e hidrofóbicas.

Figura 41 - Micrografias das moléculas de amido nativo adicionadas de anidrido succínico (figura 11A) e das moléculas de nanoamido sonicado adicionado de anidrido succínico (figura 11B) obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 4500x

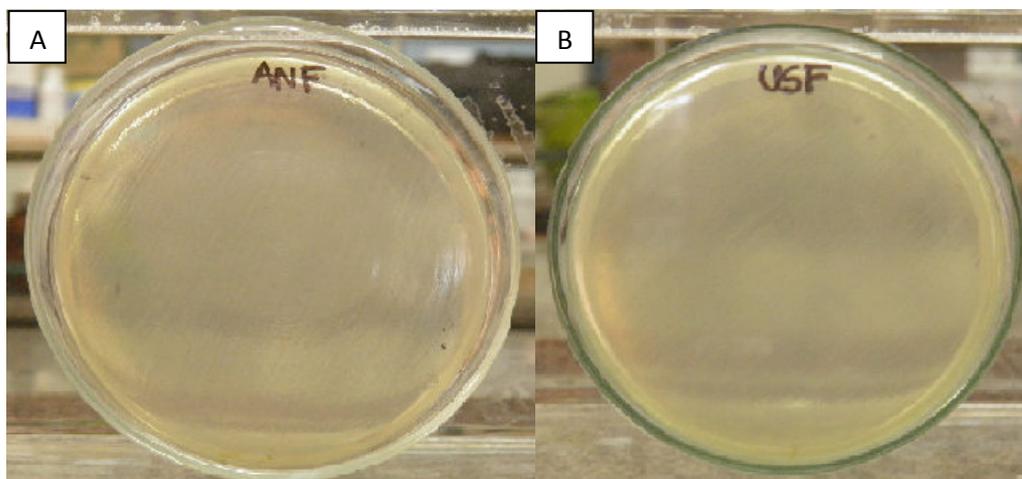


Quando comparadas às imagens obtidas do AN e US sem adição de anidrido succínico, as micrografias visualizadas acima apresentam superfície bastante rugosa devido à ação do anidrido succínico.

5.11.2 ADIÇÃO DA NISINA ÀS PARTÍCULAS DE AMIDO

A adsorção da nisina às moléculas de amido, ocorrida devido à diferença de carga entre elas e conseqüente atração eletrostática, mostrou-se eficiente, pois a inexistência dos halos de inibição dos materiais filtrados (Figura 12) durante a centrifugação - conforme item 4.12.5 - das amostras (de amido nativo e nanoamido sonicado adicionados de anidrido succínico e nisina) é um indício que índice de incorporação foi alto, pois a utilização de filtros com membrana de 10 KDa permitiria a passagem de nisina livre. Logo, se esta estivesse presente no material filtrado, poderia ser observada a formação dos halos.

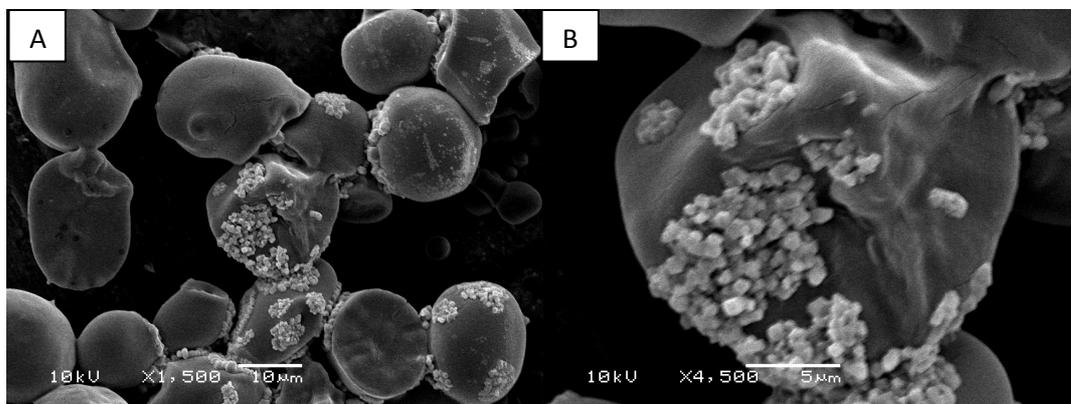
Figura 52 - Amido nativo filtrado (Figura 12A) e nanoamido sonicado (Figura 12B) em placas de ágar BHI inoculadas com *L. monocytogenes*



As imagens obtidas (Figura 13) mostram a adsorção da nisina às moléculas de amido nativo com a carga modificada (AN + AS). Conforme a figura, sugere-se que houve atração superficial devido aos diferentes potenciais eletrostáticos apresentados pelas amostras e não ocorreu o encapsulamento da nisina. Este resultado era esperado uma vez que adição da nisina às moléculas de amido deu-se apenas pelo contato das duas em solução e não através das metodologias utilizadas para microencapsulação, como *spray-dryer*. Alguns pesquisadores classificam o resultado obtido neste trabalho como sendo microesferas. Azeredo (2005) e Constant (2002) incluem as microesferas na categoria de cápsulas. Entretanto, outros como Depypere et al. (2003) consideram que na encapsulação não ocorre a exposição superficial do material de recheio (nisina) e defendem esta idéia como sendo a principal diferença entre microesferas e microcápsulas.

O mecanismo ocorrido entre as moléculas de AN +AS é conhecido, segundo Sposito (1989), como adsorção eletrostática, a qual envolve a formação de complexos de esfera-externa. Ford et al. (2001) relataram que para a ocorrência desse fenômeno é necessário a existência de cargas elétricas permanentes. Este tipo de adsorção ocorre quando um íon carregado entra no campo de influência de uma superfície sólida que possui carga líquida superficial oposta.

Figura 13 - Micrografias das moléculas de amido nativo com microesferas de nisina obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com aumento de 1500x (Figura 13A) e 4500x (Figura 13B)



Quando a nisina foi incorporada em partículas dos nanoamidos sonicados não foram observadas diferenças morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura. Sugere-se que isso tenha ocorrido devido à escala nanométrica das moléculas, o que contribuiu para que não ocorresse a ligação de aglomereados de nisina, como foi observado nas moléculas de amido nativo com microesferas de nisina (Figura 13). Neste caso, a agregação do antimicrobiano pode ter ocorrido de maneira mais individualizada. Entretanto, pode-se dizer que ocorreu a adsorção da nisina, uma vez que potencial zeta dessa amostra foi muito semelhante ao apresentado pelas moléculas de amido nativo (AN + AS + NISINA), conforme pode ser observado na Tabela 16. Izidoro (2011) também observou em sua pesquisa que os grânulos de amido de banana verde que foram sonicados e secos em *spray-dryer* apresentaram-se agregados.

Tabela 16. Potencial Zeta das amostras de amido nativo e nanoamido sonicado adicionados de anidrido succínico e nisina.

	Potencial Zeta (mV)
AN + AS + NISINA	- 13,90 ^b ± 0,35
US + AS + NISINA	- 11,62 ^a ± 0,30

*média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b}Letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Comparando os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16, observa-se que a adição da nisina às amostras resultou no aumento do potencial zeta devido à neutralização das cargas durante a atração eletrostática. As amostras contendo amido nativo aumentaram o potencial

eletrostático de -16,7 mV para -13,90 mV, enquanto os nanoamidos sonicados passaram de -17,15 mV para -11,62 mV. Estes apresentaram maior aumento do potencial, sugerindo maior atração entre as os grânulos de amido e a nisina.

5.11.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da formação de halos de inibição em placas de ágar BHI inoculadas com *L. monocytogenes*. As amostras retidas nas membranas de 10 KDa (AN + AS + NISINA e AUS + AS + NISINA) apresentaram halos de inibição contra *L. monocytogenes*. Os valores dos halos de inibição das amostras de microesferas de amido nativo com nisina incorporada são apresentados nas Tabelas 17 a 20.

Tabela 17. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas.

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO AMIDO NATIVO RETIDO								
T _{armazenamento} = 4°C								
dias	Diluição							Atividade (UA mL ⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	11	11	11	10,5	9	7	X	3200
6	11	11	11	10	9	X	X	1600
9	10	10	10	10	8,5	X	X	1600
12	10	10	9,5	9	8	X	X	1600
15	10	10	9	9	7	X	X	1600
18	9	9	9	8	X	X	X	800
21	9	9	9	8	X	X	X	800

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
 UA mL⁻¹: Unidades arbitrárias por mL

Tabela 18. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas.

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO AMIDO NATIVO RETIDO								
T_{armazenamento} = 37°C								
dias	Diluição							Atividade (UA mL⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	12	10	10	9	8	X	X	1600
6	11	10	10	9	8	X	X	1600
9	11	10	9	8	X	X	X	800
12	11	10	9	8	X	X	X	800
15	10	10	9	8	X	X	X	800
18	10	9	9	8	X	X	X	800
21	10	9	9	8	X	X	X	800

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
 UA mL⁻¹: Unidades arbitrarias por mL

As Tabelas 19 e 20 apresentam os halos de inibição das amostras inoculadas nas placas com ágar BHI (com inoculação prévia de *L. monocytogenes*) e mantidas a 4°C (tabela 19) e a 37°C (tabela 20). Através da análise dessas tabelas, pode-se observar que as placas que ficaram a uma temperatura de refrigeração resultaram em maiores halos de inibição no dia 3 (correspondendo a uma atividade de 3200 UA mL⁻¹) e nos dias 9, 12 e 15 (1600 UA mL⁻¹) quando comparadas aquelas armazenadas a uma temperatura mais elevada. Esta diferença pode ser explicada pela temperatura na qual se situa a taxa de crescimento ótimo da *L. monocytogenes* (30-37°C), o que ocasionaria maior consumo da nisina a fim de combater o microrganismo e, portanto, levaria a diminuição do halo ao longo do tempo.

Tabela 19. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO AMIDO NATIVO RETIDO								
T_{armazenamento} = 4°C								
dias	Diluição							Atividade (UA mL⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	9	9	9	9	8	7	X	3200
6	9	10	9	9	9	8	X	3200
9	11	10	10	9	8	8	X	3200
12	11,5	10	9,5	9	8	X	X	1600
15	11	9,5	9,5	9	8	X	X	1600
18	11	10	9	9	8	X	X	1600
21	11	10	10	9	8	X	X	1600

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
 UA mL⁻¹: Unidades arbitrarias por mL

Tabela 20. Halos de inibição (mm) do amido nativo de pinhão com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO AMIDO NATIVO RETIDO								
T _{armazenamento} = 37°C								
dias	Diluição							Atividade (UA mL ⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	10	9	9	8	8	X	X	1600
6	9	9	9	8	8	X	X	1600
9	9	9	9	8	8	X	X	1600
12	10	9,5	9,5	9	X	X	X	800
15	10	9	9	9	X	X	X	800
18	10	9	9	9	X	X	X	800
21	10	9	9	9	X	X	X	800

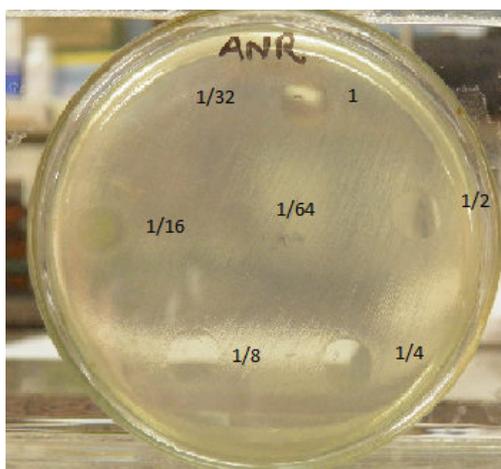
Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
UA mL⁻¹: Unidades arbitrárias por mL

Os resultados expressos nas Tabelas 19 e 20 correspondem às amostras que foram armazenadas por sete dias a 4°C e depois inoculadas em placas com ágar BHI (incubadas a 4°C, Tabela 19 - e a 37°C, Tabela 20). As placas armazenadas a temperatura mais baixa apresentaram maior atividade no decorrer dos 21 dias quando comparadas as mantidas a 37°C, o que também pode ser explicado pela temperatura ótima de crescimento da *L. monocytogenes*.

Ao comparar os halos de inibição das amostras que foram armazenadas por 24 horas e sete dias, observa-se que as conservadas por mais tempo exibiram maior atividade em ambas as temperaturas nas quais as placas foram mantidas. Nas placas incubadas a 4°C, as amostras armazenadas por período mais longo apresentaram atividade antimicrobiana por 9 dias na diluição 1/32 (3200 UA mL⁻¹), enquanto amostras armazenadas por 24 horas apresentaram halos de inibição por apenas 3 dias com essa mesma atividade. Em relação às placas mantidas a 37°C, verifica-se uma diferença mais sutil, apresentando diferença de atividade apenas no 9º dia na concentração de 1600 UA mL⁻¹. Para justificar esse aumento de atividade, sugere-se que durante o tempo de armazenamento possa ter ocorrido a liberação parcial de algumas moléculas de nisina que estavam aderidas à superfície das microesferas de amido. Portanto, quando foi feita a inoculação das amostras nas placas de ágar BHI, a presença de nisina livre ocasionou o aumento da atividade antimicrobiana.

A Figura 14 mostra os halos de inibição da amostra de amido nativo contendo nisina incorporada, visíveis até a diluição de 1/32 (3200 UA mL^{-1}) no 3º dia de armazenamento a 4°C .

Figura 14 - Halos de inibição do amido nativo de pinhão com nisina incorporada apresentados no 3º dia de armazenamento em placas com ágar BHI previamente inoculadas com *L. monocytogenes*



As Tabelas 21 a 24 expressam os resultados obtidos quando as amostras de nanoamidos obtidos por sonicação e com nisina incorporada foram testadas para atividade antimicrobiana nas mesmas condições do amido nativo com bacteriocina incorporada.

Tabela 21. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C . Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO NANOAMIDO SUBMETIDO A ONDAS ULTRASSÔNICAS - $T_{\text{armazenamento}} = 4^\circ\text{C}$								
dias	Diluição							Atividade (UA mL^{-1})
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	10	9	9	9	8	X	X	1600
6	10	9	9	9	8	X	X	1600
9	10	9	9	9	X	X	X	800
12	9	9	9	8	X	X	X	800
15	9	9	9	8	X	X	X	800
18	9	9	9	8	X	X	X	800
21	9	9	9	8	X	X	X	800

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
 UA mL^{-1} : Unidades arbitrárias por mL

Tabela 22. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de 24 horas.

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO NANOAMIDO SUBMETIDO A ONDAS ULTRASSÔNICAS T_{armazenamento} = 37°C								
dias	Diluição							Atividade (UA mL⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	10	9,5	9,5	8	8	X	X	1600
6	19	9,5	9	8	X	X	X	800
9	10	9,5	9	8	X	X	X	800
12	9	9	8,5	7,5	X	X	X	800
15	11	9	8,5	7,5	X	X	X	800
18	9	9	8,5	7	X	X	X	800
21	9	9	8,5	7	X	X	X	800

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
UA mL⁻¹: Unidades arbitrárias por mL

As Tabelas 21 e 22 apresentam os halos de inibição das amostras inoculadas nas placas com ágar BHI (com inoculação prévia de *L. monocytogenes*) e mantidas a 4°C (Tabela 21) e a 37°C (Tabela 22). Através da análise dessas tabelas, pode-se observar que a atividade antimicrobiana apresentada nas duas temperaturas de armazenamento não diferiu muito entre si, a não ser pelo fato de que a placa incubada a 4°C apresentou halo de inibição no 6º dia na concentração de 1600 UA ml⁻¹. As placas que ficaram a uma temperatura mais baixa resultaram em halos de inibição constantes a partir do 12º dia de armazenamento.

Tabela 23. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 4°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO NANOAMIDO SUBMETIDO A ONDAS ULTRASSÔNICAS - T_{armazenamento} = 4°C								
dias	Diluição							Atividade (UA mL⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	10	10	9	9	X	X	X	800
6	10	10	9	9	X	X	X	800
9	11	11	9	9	X	X	X	800
12	11	11	9,5	X	X	X	X	400
15	10,5	11	9	X	X	X	X	400
18	11	11	10	X	X	X	X	400
21	11	11	9	X	X	X	X	400

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
UA mL⁻¹: Unidades arbitrárias por mL

Tabela 24. Halos de inibição (mm) do nanoamido submetido a ondas ultrassônicas com nisina incorporada, armazenado a temperatura de 37°C. Tempo de armazenamento prévio à inoculação de sete dias.

HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DO NANOAMIDO SUBMETIDO A ONDAS ULTRASSÔNICAS - T _{armazenamento} = 37°C								
Dias	Diluição							Atividade (UA mL ⁻¹)
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	
3	9	9	X	X	X	X	X	200
6	9	9	X	X	X	X	X	200
9	10	10	X	X	X	X	X	200
12	10	10	X	X	X	X	X	200
15	10	10	X	X	X	X	X	200
18	10	10	X	X	X	X	X	200
21	10	9,5	X	X	X	X	X	200

Média de três observações com desvio padrão inferior a 10%
UA mL⁻¹: Unidades arbitrárias por mL

Os resultados expressos nas Tabelas 23 e 24 dizem respeito às amostras de nanoamidos sonicados com microesferas de nisina aderidas à superfície que foram armazenadas por sete dias a 4°C e depois inoculadas em placas com ágar BHI (incubadas a 4°C, Tabela 23 - e a 37°C, Tabela 24). As placas armazenadas a temperatura mais baixa apresentaram maior atividade no decorrer dos 21 dias quando comparadas as mantidas a 37°C, o que também pode ser explicado pela temperatura ótima de crescimento da *L. monocytogenes*. A atividade da bacteriocina medida na placa incubada a 37°C permaneceu praticamente inalterada no decorrer dos 21 de armazenamento.

Quando comparadas com as placas nas quais foram inoculadas soluções contendo moléculas de amido nativo com microesferas de nisina, observa-se que as nanomoléculas apresentaram atividade antimicrobiana mais baixa, sugerindo que estas possuam menor estabilidade.

Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos (MAGENHEIM; BENITA, 1991; MALPECERES et al., 1997). Para o monitoramento da estabilidade das suspensões coloidais poliméricas podem ser utilizados alguns parâmetros físico-químicos, como tamanho de partícula, potencial zeta, pH e distribuição da massa molar do polímero (CALVO et al., 1996; GUTERRES et al., 1995).

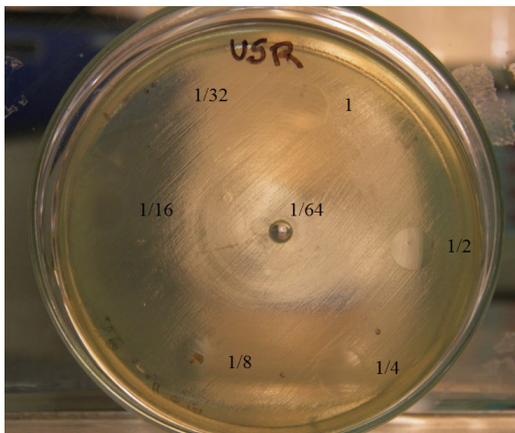
Nesse trabalho foram analisadas a polidispersividade e o potencial zeta das amostras. Segundo Moraes (2009), o índice de polidispersão pode ser indicativo de estabilidade uma vez que representa a faixa de distribuição do diâmetro de partícula. De acordo com a autora, valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro de partículas em suspensão e variações nos valores de polidispersão em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação ou quebra/degradação de partículas. Índices de polidispersão menores que 0,2 são ideais, pois evidenciam que a distribuição do diâmetro de partículas encontra-se em uma faixa estreita. A polidispersividade da amostra de nanoamidos sonicados com microesferas de nisina foi de $0,380 \pm 0,094$, o que pode sugerir certa instabilidade da amostra e conseqüente agregação das moléculas, dificultando, assim, a liberação das moléculas de nisina.

Outro parâmetro que pode reforçar a hipótese da instabilidade dessa amostra é o potencial zeta, o qual reflete a carga na superfície das partículas e é determinado pelo balanço de forças repulsivas e atrativas que as partículas apresentam. Portanto, grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação. Pode-se considerar que nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente (+/-) 30 são mais estáveis em suspensão (SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006). No presente estudo, foi possível observar aumento no potencial zeta, passando de $-17,15 \pm 1,13$ mV para $-11,62 \pm 0,30$ mV quando ocorreu adição da nisina, o que sugere um aumento da instabilidade da amostra US + AS + NISINA em suspensão.

Portanto, os dois fatores analisados tendenciam a conclusão que a estabilidade da amostra foi afetada na presença de nisina, ocasionando agregação das moléculas durante o tempo de armazenamento e, com isso, dificultando a liberação da bacteriocina e impedindo a formação de halos de inibição em concentrações maiores de unidades arbitrárias por mL.

A figura 15 mostra os halos de inibição da amostra de nanoamido sonificado retido na membrana de 10K, visíveis até a diluição de 1/16 (1600 UA mL^{-1}) no 3º dia de armazenamento a 4°C.

Figura 15 - Halos de inibição do nanoamido sonicado com nisina incorporada apresentados no 3º dia de armazenamento em placas com ágar BHI previamente inoculadas com *L. monocytogenes*



6. CONCLUSÃO

O rendimento, tanto do processo de extração do amido das sementes de pinhão, quanto dos protocolos de modificação, foi baixo devido à grande quantidade de pó aderida nas paredes da câmara de secagem.

Em relação à composição centesimal, as amostras diferiram apenas em relação ao teor de amido e amilose presentes. Houve diferença significativa entre as três amostras no percentual de água exsudada e nos três parâmetros de colorimetria (L^* , a^* e b^*), sendo que as moléculas de amido nativo foram as que apresentaram maior teor de luminosidade e os grânulos ácido-modificados resultaram maior percentual de sinérese. A amostra AHA diferiu significativamente das demais em outros aspectos: solubilidade (apresentando-se mais solúvel que as demais), higroscopicidade (mais higroscópica) e claridade de pasta (sendo a mais translúcida).

Os protocolos utilizados para modificar as moléculas de amido de pinhão nativo mostraram-se eficazes, pois ambas amostras atingiram tamanho nanométrico e diminuíram seus diâmetros em, aproximadamente, 98% em relação a amostra de AN. O índice de cristalinidade manteve praticamente inalterado e as imagens obtidas por MEV acusaram diferenças na superfície das moléculas, passando de superfície sem presença de irregularidades (AN) para superfícies com depressões (AUS e AHA).

Entretanto, aspectos como a manipulação das sementes de pinhão, o baixo rendimento dos processos de modificação e o tempo necessário para a obtenção dos nanoamidos hidrolisados na presença de ácido clorídrico devem ser considerados.

A utilização do anidrido succínico também implicou resultados satisfatórios, reduzindo o potencial zeta e facilitando a adsorção das moléculas de nisina. As moléculas de amido nativo e modificado incorporadas de nisina apresentaram atividade antimicrobiana, mantendo halo de inibição até o 21º dia de armazenamento. As placas mantidas em temperaturas mais baixas mantiveram atividade por mais tempo e com maiores diluições. Sugere-se que as nanomoléculas sonicadas com microesferas de nisina sejam menos estáveis, pois as placas que foram inoculadas com amostras armazenadas por 7 dias a 4°C apresentaram decréscimo da atividade antimicrobiana. Esta instabilidade também pode ser observada devido ao índice de polidispersividade (distribuição do diâmetro das partículas em uma faixa

estreita) e ao potencial zeta. Entretanto, deve-se ressaltar que não se avaliou o efeito antimicrobiano dessas amostras em alimentos, com os quais haveria possíveis interações da nisina com constituintes dos alimentos, como lipídeos.

Dentre possíveis perspectivas, pode-se citar a aplicação dessas amostras incorporadas com microesferas de nisina em embalagens comestíveis e produtos lácteos, a fim de prolongar a vida útil dos alimentos.

REFERÊNCIAS

ACUÑA, L.; PICARIELLO, G.; SESMA, F.; MORERO, R.D.; BELLOMIO, A. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. **The Federation of European Biochemical Societies Open BIO**, Argentina, n.2, p.12-19, 2012.

ADEDOKUN, M.O.; ITIOLA, O.A. Material properties and compaction characteristics of natural and pregelatinized forms of four starches. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, GB, v.79, n.4, p. 818-824. 2010.

AGENTES antimicrobianos: agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n.15, p. 36-42, 2010. Disponível em:< <http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2012.

ALBANUS, C.B. Miniaturização de grânulos amiláceos. In: Salão de Iniciação Científica, 21., Porto Alegre, 2009. **Livro de resumos**. Porto Alegre : UFRGS, 2009.

ALIYU M., HEPHER M.J., Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material, **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, GB, v.7, n.4, p. 265–268, out. 2000

AL-MUHTASEB, A.H.; MCMINN, W.A.M.; MAGEE, T.R.A. Water sorption isotherms of starch powder, Part 2. Thermodynamic characteristics. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v.62, n.2, p.135-142, abril 2004.

ANDRADE C.T., BARROS L.A.M., LIMA M.C.P., AZERO E.G. Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions, **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, GB, v.34, n.4, p. 233–240, ago. 2004.

ANON.M.A. Irradiation in the production processing and handling of food. Dept. of Health and Human Services Food and Drug Administration., 1990, 44, 92.

ASHOKKUMAR, M. et al. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, NL, v.9, n.2, p.155-160, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington, 1990.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, São Paulo, v.16, n.1, p. 89-97, 2005.

BARROS, R.B. Obtenção de amido e seus derivados. Refinações de milho Brasil LTDA. 35 p.; 1984.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. 316p. v.3

- BAXTER S., ZIVANOVIC S., WEISS J., Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan, **Food Hydrocolloids**, Oxford, GB, v.19, n.5, p. 821–830, nov. 2005
- BELLO-PÉREZ et al. Isolation and characterization of Starch from seeds of *Araucaria Brasiliensis*: a novel Starch for application in food industry. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.58, n.6, p. 283-291, 2006a.
- BELLO-PÉREZ, L. A. et al. Macromolecular features of starches determined by aqueous high-performance size exclusion chromatography. **Journal of Cereal Science**, London, v.27, n.3, p. 267–278, 1998.
- BELLO-PÉREZ, L. A.; MONTEALVO, M. G. M.; ACEVEDO, E. G. Almidón: definición, estructura y propiedades. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. **Carboidratos em alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: Editora da USP, 2008. 646 p.
- BERSOT, L. S.; LANDGRAF, M. FRANCO, B.D.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, São Paulo, v.57, n.1, p. 13-17, 2001.
- BI, L. et al. Designing carbohydrate nanoparticles for prolonged efficacy of antimicrobial peptide, **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.150, n.2, p. 150-156, mar. 2011.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos Alimentos**. 2ed. São Paulo: Varela, 1995. 223p.
- BORGES, S.S.; KORN, M. Geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 25, n. 4, p. 558-562, 2002.
- BRANDÃO, P. **Determinação de tamanho de partícula por espalhamento de luz: magnesita refratários**. Contagem, MG:[s.ed.], 2008.
- BRANEN, J.K.; DAVIDSON, P.M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.90, n.1, p.63-74, jan. 2004.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALLS, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Biomacromolecules**, Washington, US, v.85, n.2, p. 85-112, 1998.
- CAI, Y.Z. & CORKE, H. (2000). Production and properties of spray dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, Chicago, Ill., US, v.65, n.7, p. 1248–1252, 2000.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, US, v.85, n.5, p.530-536, maio 1996.
- CAMERON M., MCMASTER L., BRITZ T., Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound, **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, GB, v.15, n.6, p. 960–964, set. 2008
- CAPELLA, A.C.V.; PENTEADO, P.T.P.S.; BALBI, M.E. Semente de *Araucaria Angustifolia*: Aspectos Morfológicos e Composição Química da Farinha. **B. CEPPA**, Curitiba. v.27, n.1, p. 135-142. Jan/jun. 2009.

CARDOSO, M.A.P.; JASKO, A.C.J.; DEMIATE, I.M. Obtenção, Purificação e Caracterização de Amidos de Milhos de Variedade Crioulas da Safra 2007/2008. Anais do XX EAIC – 20 a 22 de outubro de 2011, UEPG, Ponta Grossa –PR.

CARRIM, A. J. I. **Bioprospecção de microrganismos endofíticos com atividade enzimática e bacteriocinogênica em isolados de Jacarandá decurrens Cham. (Carobinha do campo)**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. Programa de Patologia Tropical e Saúde Pública. Goiânia, 2005.

CEREDA, M., VILPOUX, O.F. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo : Fundação Cargill, 2003. v.3, 711p.

CEREDA, M.P. Amidos Modificados, In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, v.1. (coord.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. vol. 3, p. 243-333.

CHANG, Y.H.; LIN, J.H.; PAN, C.L Type and concentration of acid on solubility and molecular size of acid-methanol-treated Rice starches differing in amylose content. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, GB, v.79, p.762-768. 2010.

CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives & Contaminants . Part A . Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, Abingdon, Inglaterra, GB, v.25, n.3, p. 241-258, 2008.

CHEN, C.; JAYAS, D. S. Evaluation of the GAB equation for the isotherms of agricultural products. **Trasactions of ASAE**, St. Joseph, Mich., US, v. 41, n. 6, p. 1755-1760, 1998.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, Oxford, v.19, n.10, p.982-989, 2008

CHUNG K.M.; MOON, T.W.; KIM, H.; CHUN, J.K. Physicochemical properties of sonicated mung bean potato, and rice starches, **Cereal Chemistry**, Saint Paul, Minn., US, v.79, n.5, p. 631– 633. 2002

CIACCO, C.F. et al. **Fabricação de amido e sua utilização**. São Paulo: Secretaria de Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. (Tecnologia Agroindustrial, 7).

CLADERA-OLIVERA, F. **Estudos tecnológicos e de engenharia para o armazenamento e processamento do pinhão**. 2008. 197f. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F.; PETERMANN, A.C.; NOREÑA, C.P.Z.; WADA, K.; MARCZAK, L.D.F. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, Inglaterra, GB, v.43, n.5, p. 900-907, maio 2008.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, n.1, p. 1-20, dez. 2001.

COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, suppl. s17 - s32, 1992.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Boletim SBCTA**, v.36. n.1, p. 12-18. 2002.

CORDENUNSI, B.R. et al. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, São Paulo, v.52, n.11, p. 3412-3416, 2004.

CÓRDOVA, K. R. V. **Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã Fuji comercial e industrial**. 2006. 148f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2006.

CRAIG, S.A.S. et al. Starch paste clarity. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, US, v.66, n.3, p. 173-182, 1989.

CULLITY, B.D.; STOCK, S.R. **Elements of X-ray diffraction**. 3.rd ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2001. 678 p.

DANNENBERG, F., KESSLER, H.G. Effect of denaturation of β -lactoglobulin on texture properties of set-style nonfat yoghurt. 2. Firmness and flow properties. **Milchwissenschaft**, Munchen, DE, v. 43, n. 11, p. 700-704, 1988.

DAUDT, R.M. **Estudo das propriedades do amido de pinhão visando a sua utilização como excipiente farmacêutico**. 125p. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre. 2012.

DEDAVID, B. A.; GOMES, I. G.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: Ed. da Pucrs, 2007.

DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F.; PIETERS, J.G. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Drying Technology**, New York, US, v.1, n. 2, p. 75-94, 2003.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, **Drying Technology Journal**, Coréia do Sul, v.23, n.7, p. 1361-1394, 2005.

DEVLEIGHRE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation Technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, Bélgica, v.14, n.4, p. 273-285, 2004.

DONOVAN, J.W.; BERKELEY, J.M. Multiple phase transitions of starches and Nāgeli amyloextrins. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v. 32, n.6, p. 190-194, 1980.

DREHER, M.I. et al. Buffalo gourd root starch II. Rheologic behaviours, freeze-thaw stability for use in food products. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.35, p. 157-162, 1983.

DUKE, P. J.; MICHETTE, A. G. (Eds.) **Modern microscopies : techniques and applications**. New York: Plenum Press. 1990.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, Chicago, Ill., US v.42, n.4, p. 136-151, 1988.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cultivo do pinheiro-do-pará. 2001. Disponível em: [HTTP://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-paraná](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-paraná).

FENLON, D. R., *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Eds). **Listeria, Listeriosis and food safety**, 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 21-37.

FENNEMA, O. **Química de los Alimentos**. Espanha: Editorial Acribia, 2000. 1258 p.

FERREIRA, C.D.; PENA, R.S. Comportamento higroscópico da farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.23, n.2, maio/agosto 2003

FORD, R.G.; SCHEINOST, A.C.; SPARKS, D.L. Frontiers in metal sorption/precipitation mechanisms on soil mineral surfaces. **Advances in Agronomy**, v.74, p. 41-62, 2001.

FRANCO, C.M.L. et al. **Culturas de Tuberosas Amiláceas latina-americanas- Propriedades gerais do amido**. Campinas : Fundação Cargill , 2002.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science**, Champaign, Ill., US, v. 37, p. 1048-1061, 1973.

GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate polymers**, Barking, Inglaterra, GB v.32, n. 3/4, p. 177-191, 1997.

GERMANI R. Controle de qualidade tecnológica do grão e da farinha de trigo. Curso de Pós-Graduação em Controle e Garantia de Qualidade de Alimentos UFRJ – Embrapa/CTAA. Módulo III: controle de qualidade químico e físico-químico. Rio de Janeiro; 1999. p.27-31.

GIBBS, B. F. E. A. Encapsulation in food industry: a review. **International Journal of Food Science Nutritional**, Canada, v.50, n.3, p. 213-224. 1999.

GIDLEY, M.J.; BOCIEK, S.M. Molecular organization in starches: a ¹³C CP/MAS NMR study. **Journal of the American Chemical Society**, v.107, n.24, p. 7040–7044, nov. 1985.

GLICKSMAN, M. **Gum technology in food industry**. San Diego: Academic Press, 1969. 590p.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, Inglaterra , GB, v.15, n.7-8, p. 330–347, 2004.

GREINER, R. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. **Nutrire**, São Paulo, v.34, n.1, p. 243-260, 2009.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, NL, v.113, n.1-2, p.57-63, 1995.

HAN, J.-A.; LIM, S.T. Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI system. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, v.55, n.3, p. 265-272, fev. 2004.

HELLSTRÖM, S. et al. *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. **Journal of Food Protection**, Finlândia, v. 73, n. 4, p. 641-648, 2010.

HENRÍQUEZ, C.; ESCOBAR, B.; FIGUEROLA, F.; CHIFFELLE, I.; SPEISKY, H.; ESTÉVEZ, A.M. Characterization of Piñon seed (*Araucaria araucana* (Mol) K. Koch) and the isolated starch from the seed. **Food Chemistry**, London, GB, v.107, n.2, p. 592-601. 2008.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. 3.ed. rev. e ampl. Nova York: Marcel Dekker, 1997. 650 p.

HOOVER, R.; SOSULSKI, F.W. Composition, structure, functionality and chemical modification of legume starches: a review. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. Ottawa, CA, v.69, n.1, p. 72-79, 1991.

HOSSAIN, M. D. et al. Sorption isotherms and heat of sorption of pineapple. **Journal of Food Engineering**, Barking, v.48, n.2, p. 103-107, 2001.

IBAMA, 2012. <http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>. Acesso em 30 de junho de 2012.

IIDA Y., TUZIUTI T., YASUI K., TOWATA A., KOZUKA T., Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, NL, v.9, n.2, p. 140–146. 2008

IMBERTY, A. et al. Recent advances in knowledge of starch structure. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.43, n. 10, p. 375–384, 1991.

IMBERTY, A.; PEREZ, S. A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. **Biopolymers**, New York, US, v.27, p. 1205-1221, 1988.

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

IZIDORO, D.R. **Influência do pré-tratamento com ultra-som e da secagem nas propriedades químicas, físicas e funcionais do amido de banana verde**. 2011. 201f. Tese. Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

JACKSON, D.S. Solubility behavior of granular corn starches in methyl sulfoxide (DMSO) as measured by high performance size exclusion chromatography. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.43, n.11, p. 422–427, 1991.

JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z.; SUBARIC D.; BABIC, J.; BRNCIC M.; BRNCIC, S. R.; TOMISLAV B.; CVEK, D.; TRIPALO, B.; GELO, J. Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, GB, v.79, n.1, p. 91-100, 2010.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAYAKODY, L.; HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. **Food Research International**, Barking, Inglaterra, GB, v.7, n. 35, p. 665-680, 2002.

JENKINS, P.J.; COMERSON, R.E.; DONALD, A.M. In situ simultaneous small and wide angle X-ray scattering: a new technique to study starch gelatinization, **Journal of Polymer Science B: polymer physics**, New York, v.32, n.8, p. 1579–1583, 1994.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, Göteborg, Sweden, v.1, p.801-832, 2008.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, Boston, US, v.7, n.2, p. 210-218, 2004.

JUNG, D.; BODYFELT, F.W.; DAESCHEL, M.A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.2, p.387–393, fev. 1992.

KARAM, L.B. **Propriedades funcionais de multi-misturas de amidos de milho, mandioca e cará e sua relação com as características físicas de moleculares**. 2003, 133f. Tese. Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2003

KAUR, G. et al. Nisin and class II bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Microbial Drug Resistance**, India. v.17, n.2, p. 197-205, 2011.

KIM, H.-S.; HUBER, K.C.; HIGLEY, J.S. Alkaline dissolution of starch facilitated by microwave heating for analysis by size-exclusion chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., US, v.54, n.26, p. 9664–9669, 2006.

KOCH, Z.; CORRÊA, M.C. **Araucária: a floresta do Brasil meridional**. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002. 148 p.

KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom. **Revista Analytica**, São Paulo, n.3, p. 34-39, 2003. Disponível em<http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed_anteciores/03/Art%20Ultra-som.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2012.

KRISTO E., BILIADERIS, C.G. **Carbohydrate Polymers**. Barking, Inglaterra, GB, v.68, n.1, p. 146-158, 2007.

LABUZA, T.P. Sorption Phenomena in Foods. **Food Technology**, Chicago, US, v.22, p. 268-272, 1975.

LACERDA, L. G. **Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias-primas tropicais**. 2006. 79f. Dissertação (mestrado). Universidade de Ponta Grossa, Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos .Ponta Grossa, 2006.

LAWAL, O.S.; ADEBOWALE, B.M.; OGUNSANWO, L.L., BARBA, N.S. Oxidized and acid thinned starch derivatives of hybrid maize: functional characteristics, wide-angle X-ray diffractometry and thermal properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Nigeria, v.1-2, n. 35, p. 71-79, 2005.

- LAWAL, O.S.; ADEBOWALE, K.O. Physicochemical characteristics and thermal properties of chemically modified Jack bean (*Canavalia ensiformes*) starch. **Carbohydrate Polymers**, v.60, n.3, p.331-341, 2005.
- LEACH, H. W.; McDOWEN, L. D.; SCHOCH, T. J. Structure of the starch granule I Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, Minn., US, v.36, n.6, p. 534-549, 1959.
- LeCORRE, D.B.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: a review. **Biomacromolecules**, Washington, US, v.11, n.5, p. 1139-1153, 2010.
- LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; JAQUEY, S. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata-doce – um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.18, n.3, p. 343-345, 1998.
- LIMA M.C.P., ANDRADE C.T. Stroma-free-hemoglobin from bovine blood, *Artif. Cells Blood Subst.* **Biotechnology**, Frankfurt, DE, v.35, n.4, p. 431–447, 2000.
- LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R.T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.56, n.3-4, p. 89-99, 2004.
- LOBO, A.R.; SILVA, G. M. D. L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, v.16, n.2, p. 219-226, jun. 2003.
- LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated [beta]-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch e maltodextrin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, GB, v.21, n.5-6, p.928-935. 2007.
- LUCCA, P.A.; TEPPER, B.J. Fat replacers and the functionality of fat in foods. *Trends in Food Science Technology*, Cambridge, Inglaterra, GB, v.5, n.1, p. 12-19, jan. 1994.
- LUO, P.G.; STUTZENBERGER, F.J. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms. In A.I. Laskin, S. Sariaslani, & G.M. Gadd (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**, London, v.63, p. 145-181, 2008.
- MACLAUHLIN, J.; HALL, S.M.; VELANI, S. K.; GILBERT, R. J. Human listeriosis and paté: a possible association. **British Medical Journal**, v. 303, n. 6805, p. 773-775, 1991.
- MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 41, n.1, p. 1–21, 2006.
- MADRAS G., KUMAR S., CHATTOPADHYAY S., Continuous distribution kinetics for ultrasonic degradation of polymers, **Polymer Degradation and Stability**, Essex, GB, v.69, n.1, p. 73–78, jun. 2000.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, US, v.1, n.4, p.221-241, 1991.
- MANNERS, D.J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, v.11, n.2, p. 87-112, 1989.

MARCON, M.J.A., AVANCINI, S.R.P.; AMANTE, E.R. **Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 101 p.

MARTÍNEZ, H. F.; OSORIO-REVILLA, G.; GALLARDO-VELÁZQUEZ, T. Optimal spray-drier encapsulation process of orange oil. In: INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM. 14., 2004. **Proceedings...** São Paulo, 2004. p. 621-627.

MASON, T. J. Power ultrasound in food processing. The way forward. In: POVEY, M. J. W.; MASON, T.J. (eds). **Ultrasound in Food Processing**. London: Chapman & Hall. 1998. p.105-126

MATSUGUMA, L.S. **Caracterização do amido de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) nativo e modificado por oxidação**. Dissertação de mestrado. 112f. 2006. Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.

MAYOR, L.; SERENO, A.M. Modeling shrinkage during convective drying of food materials: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v.61, n.3, p.373-386, 2004

MAZZA,G.; LEMAGUER, M. Dehydration of onion: some theoretical and practical considerations. **Journal of Food Technology**, Oxford, Inglaterra, GB, v.15, p.181-194. 1980.

McCARTHY, M. J. et al. **Engineering properties of foods**. 3 rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 738p.

MESTRE, C. Los estados físicos del almidón. In.: Conferencia Internacional del almidón. Quito. **Anais...** Quito: Escuela Politécnica Nacional, Instituto de Investigación Tecnológica, 1996. p. 1-16.

MINOLTA. **Comunicação precisa da cor: controle de qualidade da preparação à instrumentação**. Japão: Minolta Corporation. 59p. 1998.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, Nigeria, v.5, n.1, p.561-573, junho 2006.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M.R.; CHACON, M.; BERGES, L.; GUZMAN, M. Stability of cyclosporine-loaded poly-sigma-caprolactone nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, London, GB, v.14, n.6, p.777-787, Nov-dez 1997.

MORAES, C.M. Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais. Dissertação de Mestrado. 141p. 2009. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Programa em Biologia Funcional e Molecular. 2009.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 92, n.1, p. 63-70, 2002.

MULET, A.; CÁRCEL, J. A.; SANJUAN, N.; BON, J. New food drying Technologies – Use of ultrasound. **Food Science and Technology International**, London, GB, v.9, n.3, p. 215-218, 2003.

MURPHY, P. Starch. In: PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. **Handbook of hydrocolloids**. New York: CRC Press, 2000. cap. 3, p. 41-65

MYERS, A.M. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, Minneapolis, Minn., US, v.122, p. 989-997, 2000.

NAGATANI, T. et al. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a Field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.1, n.3, p. 901-909, 1987.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.11, n.2, p.120-127, 2008.

NATIONAL STARCH & CHEMICAL INDUSTRIAL. **Como escolher**: um guia profissional para amidos alimentícios. São Paulo, 1997, 8p.

NBTC. Nanobiotechnology Center. Zeta Potential Theory. Disponível em: <<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>>. Acesso em: 28 Jan. 2013.

NUNES, L.S.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. Avaliação do comportamento higroscópico de amido de inhame. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.2, p. 149-158, 2009.

OLIVEIRA, T.M. **Desenvolvimento e avaliação de filme biodegradável de polietileno incorporado de amido de grão de bico (*Cicer arietinum L.*)**. 2007.122f. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Viçosa, 2007.

OLIVEIRA, T.M.; PIROZI, M.R.; BORGES, J.T. da S.; GERMANI, R.; FONTES, M.P.F. Caracterização do amido de grão de bico (*Cicer arietinum L.*). **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 27-42, 2009.

ORDÓÑEZ, J, A et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto alegre: Ed. Artmed, 2005. v.1

PARIS, M. et al. Crystallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by ¹³C-P-MAS NMR spectroscopy 1: spectral decomposition. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, v.39, n.4, p. 327-339, 1999.

PARKER, R; RING, S.G. Aspects of the physical chemical of starch. **Journal of Cereal Science**, London, v.34, n.1, p. 1-17, 2001.

PERERA, C.; HOOVER, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**, London, v. 64, n.3, p. 362-375, 1999.

PETRI, M. Food processing and preservation. **Scandinavian Dairy Information**, Helsingborg, Suécia, . 1991, v.5, n.26.

PORTENLAENGER, G.; HEUSINGER, H. The influence of frequency on the mechanical and radical effects for the ultrasonic degradation of dextrans. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, GB, v.4, n.2, p.127-130, abr. 1997.

PRICE G.J., SMITH P.F. Ultrasonic degradation of polymer solutions. III. The effect of changing solvent and solution concentration, **European Polymers**. J. 29. 419– 424. 1993

RADLEY, J.A. **Industrial uses of starch and its derivatives**. London: Applied science publishers Ltda. 276 p. 1976.

RISH, S. J., Encapsulation: overview of uses and techniques. In: RISH, S. J.; REINECCIUS, G. A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995. p. 2-7

RÓRVIK, L. M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D.A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, Inglaterra , v.94, n.4, p. 633-640, 2003.

ROSENTHAL, F.R.T. et al. Structure of starch granules - part 3: some considerations of leguminosae and tuberosae. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.26, n.2, p. 50-56, 1974.

SALGADO, S.M.; GUERRA, N.B; ANDRADR, S.A.C.; LIVERA, A.V.S. Caracterização Físico-Química do Grânulo do Amido de Feijão Caupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.25, n.3, p. 525-530, 2005.

SAMANIEGO-ESGUERRA, C. M.; BOAG, I. F.; ROBERTSON, G. L. Comparison of regression methods for fitting the Gab model to the moisture isotherms of some dried fruit and vegetables. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v. 13, n. 2, p. 115-133, 1991.

SANDHU, K.S; KAUR, M.; SINGH, N.; LIM, S. A comparison of native and oxidized normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. **Food Science and Technology**, London, GB, v.41, n.6, p.1000-1010, 2008.

SANTOS, A. C. A., SERAFINI, L. A., CASSEL, E. **Estudo de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 19-29, 2003.

SANTOS, A.J, dos; CORSO, N.M.; MARTINS, G.; BITTENCOURT, E.. Aspectos produtivos e comerciais do pinhão no Estado do Paraná. **Revista Floresta**, Paraná, v.32, n.2, p. 163-169. 2002.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Sao Paulo, SP, v.26, n.5, p. 726-737, 2003.

SCHEFFLER, S.L.; WANG, X.; HUANG, L.; GONZALES, F.S.M.; YAO, Y. Phytoglycogen octenyl succinate, an amphiphilic carbohydrate nanoparticle, and ϵ -polylysine to improve lipid oxidative stability of emulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, Pa., US, v.58, n.1, p. 660-667, 2010.

SCHMITZ, D. C.; PERES, G. L.; SILVEIRA, N. P. **Controle da cadeia polimérica do amido através da técnica de espalhamento de luz**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Resumo publicado em evento. Porto Alegre. 2011.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* sp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.16, n.4, p. 403-411, 2005.

SEGUCHI M., HIGASA T., MORI T. Study of wheat starch structures by sonication treatment. **Cereal chemistry**, Saint Paul, Minn., US. v.71, n.6, p. 636–639. 1994

SIKORA, M. et al. Use of Modified starches as thickeners of cocoa syrups. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 5, p. 347-354, 2004.

SILVA, E. M. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão**. 2011. 43f. Trabalho de conclusão (graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Curso de Engenharia Química, Porto Alegre, 2011.

SILVA, L.A.D. **Produção e Caracterização de Enzimas Celulásicas por *Aspergillus phoenicis***. 2008. 119p. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, 2008.

SINGH, G.D.; BAWA, A.S.; RIAR, C.S.; SAXENA, D.C. Influence of heat-moisture treatment and acid modifications on physicochemical, rheological, thermal and morphological characteristics of Indian Water Chestnut (*Trapa natans*) starch and its application in biodegradable films. **Starch**, Weinheim, Alemanha, DE, v.61, p. 503-513, 2009.

SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources: review. **Food Chemistry**, London, v.81, n.2, p. 219-231, 2003.

SINGH, N.; SANDHU, K.S.; KAUR, M. Characterization of starches separated from Indian chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, n.63, n.4, p. 441-449, agosto 2004.

SINGH, V.; ALI S.Z. Acid degradation of starch: the effect of acid and starch type. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, GB, v.41, n.2, p.191-195, 2000.

SINGHAL, R.S.; GUPTA, A.K.; KULKARNI, P.R. Low-calorie fat substitutes. Trends in Food Science Technology, Cambridge, GB, v.2, p. 241-244, 1991.

SODHI, N. S.; SINGH, N. Morphological, thermal and rheological properties of starches separated from rice cultivars grown in India. **Food Chemistry**, London, GB, v.80, n.1, p. 99-108, 2003.

SONG, D. et al. Surface modification of cellulose fibers by starch grafting with crosslinkers. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.113, n.5, 3019-3026, 2009.

SONG, D.; THIO, Y.S.; DENG, Y. Starch nanoparticle formation via reactive extrusion and related mechanism study. **Carbohydrate Polymers**, Barking, GB p. 7. 2011.

SPOMBERG, S. Uso de Difractometria de Raios-X na Quantificação de Ferrita e Austenita em Aços Inoxidáveis Dúplex. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, DIDÁTICA E DE AÇÕES SOCIAIS E DE EXTENSÃO DA FEI. 1., 2010. São Bernardo do Campo. **Anais ...** São Bernardo do Campo : Faculdade de Engenharia Industrial, 2010. Disponível em: <<http://fei.edu.br/70anos/simposio/trabalhos/Materiais/Uso%20de%20Difractometria%20de%20Raios-x%20na%20Quantifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20Ferrita%20.pdf>> . Acesso em: 20 dez. 2012.

SPOSITO, G. **The Chemistry of Solis**. New York: Oxford, 176p., 1989.

STAHL, J. A.; **Efeito da modificação por fosfatação sobre as características do amido de pinhão**. 2003. 128f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria, 2003.

STAHL, J.A.; LOBATO, L.P.; BOCHI, V.C.; KUBOTA, E.H.; GUTKOSKI, L.C.; EMANUELLI, T. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia* Bert, O. Ktze) starch phosphates. **Food and Science Technology**, London, GB, v.40, n.7, p.1206-1214, 2007.

SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. **Starch**, Weinheim, Alemanha v.37, n.1, p. 1-5, 1985.

SWINKELS, J.J.M. **Industrial starch chemistry**: Properties, modifications and applications of starches. Veendam: AVEBE, 1996, 48p.

TAKIZAWA, F.F.; SILVA, G.O.; KONKEL, F.E.; DEMIATE, I.M. Characterization of tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, PR, v.47, n.6, p. 921-931, Nov. 2004.

TEIXEIRA, M. L. **Purificação e Caracterização de um Peptídeo Antimicrobiano produzido por *Bacillus liqueniformis***. 80f. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre, 2007.

TESTER, R. F., KARKALAS, J. & QI, X. Starch composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, n.2, p.151-165, 2004.

THIES, C. **How to make microcapsules**. St Louis, Missouri: Lecture and Laboratory, 1995.

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

THYS, R.C.S et al. Effect of the alkaline treatment on the ultrastructure of C-Type. **Biomacromolecules**, Washington, v.9, n.7, p. 1894-1901, 2008.

THYS, R.C.S. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**. 156f. 2009. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2009.

THYS, R.C.S.; NOREÑA, C.P.Z.; MARCZAK, L.D.F.; AIRES, A.G.; CLADERA-OLIVERA, F. Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch and thermodynamic analysis. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v.100, n.3, p. 468-473. 2010.

TOLEDO, M. M. **Crescimento de *Lactococcus lactis* Subsp. *Lactis* NCK 400 e Produção de Nisina em Meio à Base de Extratos Vegetais**. 66p., 2000. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Viçosa, 2000.

UGUCIONI, J. C. **Iodeto de mercúrio (HgI₂) para aplicações em detectores de radiação**. 86f. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, USP, Programa de Física Aplicada a Medicina e Biologia, 2005.

VANDERVEEN, J.E.; GLINSMANN, W.H. Fat substitutes: a regulatory perspective. **Annual Review of Nutrition**, California, v.12, p. 473-487, jul. 1992.

VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, Colombia v.36, n. 1, 2009.

WANG, Y.J.; TRUONG, V.-D.; WANG, L. Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra, v.52, n.3, p. 327-333, 2003.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Molecular structure of starch. In: **Starch: chemistry and technology**. New York: Academic Press, 1990. p. 153-182

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. **Starch: chemistry and technology**. 2nd ed. New York : Academic Press , 1984.

WHISTON, C. **X-ray methods**. Ed. John Wiley & Sons, v.11, 1987, 448p. , (cap. 5 e 6).

WOSIACKI, G.; CEREDA, M.P. Characterization of pinhao starch. Part I: - Extraction and properties of pinhao starch. **Starch**, v.37, n.7, p. 224-227. 1985.

WURZBURG, O.B. **Modified starches: properties and Uses**. Boca Raton: CRC Press, 1986.

WURZBURG, O.B. **Modified Starches: Properties and Uses**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989, 277 p.

YAMANI, B.V. **Caracterização físico-química e funcional de amido de tuberosas originárias da América do Sul: oca (*Oxalis tuberosa* Molina), alluco (*Ullucus tuberosus* Cladas) e mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz e Pavón)**. Dissertação de mestrado. 120f. 2010. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Área de Bromatologia. Universidade de São Paulo, 2010.

YAO, Y. Chapter: **Biosynthesis of starch**, in: Hans Kamerling (Ed.), **Comprehensive Glycoscience**, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2007.

YOU, S.; LIM, S.T. Molecular characterization of corn starch using na aqueous HPSEC-MALLS-RI system under various dissolution and analytical conditions. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, Minn., US, v.77, n.3, p. 303-308, 2000.

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

ZAMBRANO, F.; CAMARGO, C.R.O. Substitutos de Gordura: Efeito da Concentração de Ácido e do Tempo de Hidrólise do Amido de Mandioca em Algumas Características dos Hidrolisados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, SP, n.22, p. 155-159, 1999.

ZANDAVALLI, R.B.; DILLENBURG, L.R.; DE SOUZA, P.V.D. Growth response of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, NL v.25, n.3, p. 245-255. 2004.

ZOBEL, H.F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch**, Weinheim, Alemanha, v.40, n.2, p. 44-50, 1988.