



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALAN LAUER

**CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES FRAÇÕES DERIVADAS DO PINHÃO
(*Araucaria angustifolia*) E SUAS APLICAÇÕES PARA O
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS.**

**CASCADEL- PR
2019**

ALAN LAUER

**CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES FRAÇÕES DERIVADAS DO PINHÃO
(*Araucaria angustifolia*) E SUAS APLICAÇÕES PARA O
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na área de pesquisa “Prospecção de substâncias e organismos bioativos com aplicações biotecnológicas e em saúde”, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña

Co-orientadora:

Profa. Dra. Luciana Mikito Bill Kottwitz

CASCADEL - PR

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Lauer, Alan

Caracterização de Diferentes Frações Derivadas do Pinhão (Araucária angustifolia) e suas Aplicações para o Desenvolvimento de Produtos / Alan Lauer; orientador(a), Luciana Oliveira de Fariña; coorientador(a), Luciana Mikito Bill Kottwitz, 2019.
126 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Farmácia. 2. Araucária. 3. Desenvolvimento de novos produtos . I. Fariña, Luciana Oliveira de. II. Kottwitz, Luciana Mikito Bill . III. Título.

ALAN LAUER

BIOGRAFIA RESUMIDA

Natural de Medianeira, Paraná, Brasil, nascido em 16 de dezembro de 1983, formou-se em Tecnologia em Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *campus* de Medianeira em dezembro de 2005. No ano seguinte, iniciou pós-graduação em Microbiologia Aplicada pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, *campus* de Cascavel, concluindo o curso e obtendo o grau de especialista em Microbiologia em junho de 2007. Formou-se em Farmácia pela Faculdade Anglo Americano (FAA), *campus* de Foz do Iguaçu em setembro de 2010. Atuou em indústria de medicamentos fitoterápicos no período de 2005 a 2010, foi responsável técnico em farmácia comercial de 2010 a 2013, após este período trabalhou em laboratório de análises clínicas durante dois anos. Atuou como professor em cursos de atendente de farmácia entre 2011 e 2013 e como tutor do curso de saúde do programa pró-jovem. Atualmente trabalha como farmacêutico responsável técnico em farmácia comercial. Ingressou no Programa de Pós Graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2017. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha “Prospecção de substâncias e organismos bioativos com aplicações biotecnológicas e em saúde”, orientado pela Professora Dra. Luciana Oliveira de Fariña.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos Orixás pela vida, bênção e proteção.

Ao meu companheiro Johnny Moreira pelo amor, amizade, incentivo, compreensão, paciência, carinho, por apoiar meus sonhos e estar sempre ao meu lado.

À minha família, em especial aos meus pais que sempre me deram amor e incentivo em todos os momentos e que me abençoam de outro plano espiritual; e a minha irmã Denise Maria Lauer Rossi que é meu maior orgulho e inspiração; e aos meus sobrinhos Guilherme e Isadora, amores da minha vida.

À minha orientadora Professora Dra. Luciana Oliveira de Fariña pela oportunidade, dedicação, confiança, paciência e conselhos na construção da minha vida acadêmica e a qual eu tenho sincera admiração e respeito. A professora, co-orientadora Dra. Luciana Mikito Bill Kottwitz, pela orientação e amizade durante todo este período de pesquisa.

Às professoras MS. Suzana Bender e Dra. Juliana Moço Correa pela amizade, conselhos e companheirismo durante o período de trabalho no laboratório.

A Professora Dra. Márcia Regina Simões pela amizade e carinho em me auxiliar na parte da estatística deste trabalho.

As minhas queridas alunas de iniciação científica Ana Caroline da Costa, Larissa Sawada e Luana Volkmann Siqueira pela amizade, carinho e dedicação que demonstraram durante todo o período de trabalho e pesquisa no laboratório, sem a ajuda de vocês não teria conseguido.

Ao aluno de intercambio Benigno Florentin Morel da Universidade Nacional de Assunção – PY, pela ajuda e dedicação no desenvolvimento de parte deste trabalho.

A minha amiga Graciela Fernández Calazans por toda amizade e grande ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos meus amigos Sander Fernando de Paula e Lindomar Antonio da Silva Figueiró, que participaram de alguma forma desta história e que tive a oportunidade de dividir alegrias, angústias e ótimas conversas.

À secretária do Mestrado Emery de Miranda pela amizade, assistência com as questões burocráticas e os vários puxões de orelha para entregas dentro dos prazos.

Aos demais professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos passados e a amizade construída.

Aos Professores membros da banca por aceitarem avaliar o trabalho e contribuírem com sugestões.

Ao PCF - UNIOESTE pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela infraestrutura disponibilizada.

A CAPES pelas bolsas de estudos concedidas no Brasil às alunas de iniciação científica que me auxiliaram imensamente neste projeto.

Aos demais amigos e colegas que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho, meu muito obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Caracterização de diferentes frações derivadas do Pinhão (*Araucaria angustifolia*) e suas aplicações para o desenvolvimento de produtos.

Resumo

Na atualidade é crescente a busca pelo desenvolvimento de novos produtos, tanto pela indústria alimentícia quanto pela farmacêutica, com aplicação de matérias-primas não convencionais. Existem produtos regionais com grande potencial de uso, ainda não totalmente explorados, como é o caso do pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*. Impulsionados pela valorização do uso de produtos com origem natural, sem uso de agrotóxicos e que apresentem características de regionalização, que valorizam os pequenos produtores e o extrativismo sustentável, o presente trabalho se propôs a estudar formas diferenciadas de utilização do pinhão proveniente da Araucária para produção de novos produtos, propiciando o aumento de seu consumo. Desta forma, foram desenvolvidos dois processos diferentes de produção de farinhas de pinhão (cru e cozido) com objetivo de aumentar a vida útil desta matéria-prima. A partir destas farinhas foi desenvolvido um leite fermentado acrescido de *Lactobacillus acidophilus* que apresentou boa qualidade nutricional e aceitação frente ao público consumidor (nota 7,68 na avaliação hedônica). Também foi desenvolvido um queijo cremoso acrescido de farinha de pinhão cozido com características inovadoras, associando os benefícios do queijo e os do pinhão, o qual apresentou boa aceitação (nota 2,60 – teste de atribuição de preferência). Ambos os produtos foram considerados fortes candidatos à produção em escala industrial, com comercialização como produtos inovadores. Como proposta de utilização completa da matéria-prima, a casca do pinhão, produto de descarte, foi utilizada para produção de extratos aquosos e hidroalcoólicos, os quais foram liofilizados e utilizados para avaliar sua ação antimicrobiana, demonstrando resultados satisfatórios frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (aquosos-17,0^l cm, hidroalcoólico-14,0^R cm) demonstrando ser um produto promissor como fitoterápico antimicrobiano. Com este trabalho foi possível o desenvolvimento de produtos com características inovadoras e potenciais para inúmeras aplicações futuras.

Palavras-Chave: Atividade antimicrobiana; Casca de pinhão; Farinha de pinhão; logurte de Pinhão; Queijo cremoso de Pinhão.

Characterization of different fractions derived from *Araucaria angustifolia* pine and its applications for products development with functional properties.

Abstract

Currently, it is a growing search for the development of new products, both by the food and pharmaceutical industries, with the application of unconventional raw materials. There are regional products with great potential for use, not yet fully explored, such as the pine nut, *Araucaria angustifolia* seed. Driven by the valorization of the use of products with natural origin, without the use of pesticides and that present regionalization characteristics, that value the small producers and the sustainable extractivism, the present work aimed to study different ways of using the *Araucaria's* pine for production of new products, increasing their consumption. Thus, two different production processes of pine nut flour (raw and cooked) were developed with the purpose of increasing the useful life of this raw material. From these flours was developed a fermented milk plus *Lactobacillus acidophilus* that presented good nutritional quality and acceptance with the consuming public (grade 7.68 in the hedonic evaluation). It was also developed a creamy cheese plus cooked pine nut flour with innovative characteristics, combining the benefits of cheese and pine nuts, which presented good acceptance (grade 2.60 - preference attribution test). Both products were considered strong candidates for industrial scale production, with commercialization as innovative products. As a proposal for the complete use of the raw material, the pinion bark, a waste product, was used to produce aqueous and hydroalcoholic extracts, which were lyophilized and used to evaluate their antimicrobial action, showing satisfactory results against *Staphylococcus aureus* strains. (aqueous-17.0I cm, hydroalcoholic-14.0R cm) proving to be a promising product as an antimicrobial phytotherapeutic. With this work it was possible to develop products with innovative and potential characteristics for countless future applications.

Keywords: Antimicrobial Activity; Pine nut shell; Pine nut flour; Pine nut Yogurt; Pine Nut Creamy Cheese.

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo Geral	3
3. Revisão bibliográfica.....	4
3.1. Caracterização botânica	4
3.2. Planta.....	6
3.3. Semente.....	7
3.4. O Pinhão como alimento	10
3.5. Pinhão na Medicina.....	11
3.6. Compostos Fitoquímicos Funcionais	11
3.7. Importância econômica	16
3.8. Usos comerciais	17
3.9. Extinção	19
4. Referências bibliográficas	21
Capítulo I – Artigo: Desenvolvimento e Caracterização de Farinha de Pinhão (<i>Araucaria angustifolia</i>)	28
1. Introdução	28
2. Metodologia.....	30
2.1. Produção da Farinha de Pinhão.....	30
2.2. Caracterização bromatológica e físico-química das farinhas.....	31
2.3. Análises microbiológicas das farinhas.....	31
2.4. Análise estatística dos dados.....	32
3. Resultados e Discussão	32
4. Conclusão	37
5. Referências bibliográficas	38
Capítulo 2. Artigo: Desenvolvimento de Iogurte adicionado de Pinhão (<i>Araucaria angustifolia</i>)	41
1. Introdução	42
2. Metodologia.....	44
2.1. Desenvolvimento de Iogurte acrescido de pinhão	44
2.2. Caracterização físico-química dos Iogurtes acrescidos de pinhão	48
2.3. Análises microbiológicas dos Iogurtes acrescidos de pinhão	49
2.4. Capacidade Antioxidante dos Iogurtes	50
2.5. Aceitabilidade sensorial	50
2.6. Análise estatística dos dados.....	51
3. Resultados e discussão.....	51
4. Avaliação sensorial	62
5. Conclusão	64

6. Referências bibliográficas	66
Capítulo 3. Artigo: Desenvolvimento de Queijo Cremoso Frescal Acrescido de Pinhão (<i>Araucaria angustifolia</i>)	72
1. Introdução	72
2. Metodologia.....	74
2.1. Análises físico-químicas dos queijos.....	77
2.2 Análises microbiológicas dos queijos	78
2.3 Análise sensorial	79
2.4 Análise Estatística dos dados.....	80
3 Resultados e discussão	80
4 Conclusão	88
5 Referências bibliográficas	89
Capítulo 4. Artigo: Desenvolvimento de Extratos da Casca do Pinhão (<i>Araucaria angustifolia</i>) e Avaliação da sua Atividade Antimicrobiana.....	93
1. Introdução	93
2. Metodologia.....	95
2.1. Preparo da solução hidroalcoólica 70%	95
2.2. Preparo dos extratos.....	96
2.3. Microorganismos Testados	97
2.4. Preparo dos inóculos	97
2.5. Ensaio de Antibiose	97
3. Resultados e discussão.....	98
4. Conclusão	101
5. Referências bibliográficas	102

Lista de Figuras

Figura 1: Floresta de <i>Araucaria angustifolia</i> na região sul do Brasil.....	4
Figura 2: Distribuição geográfica da <i>Araucaria angustifolia</i> na região sul do Brasil.	5
Figura 3: <i>Araucaria angustifolia</i> : Estróbilo fêmea (A) e macho (B).....	7
Figura 4: Sementes cozidas de <i>Araucaria angustifolia</i> (pinhão) mostrando revestimento externo (A), seção longitudinal exibindo embrião (B) e porção comestível interna (C).	8
Figura 5: Araucária (a) e pinha com os pinhões (b).	9
Figura 6: Usos de produtos derivados de <i>Araucaria angustifolia</i> :	18
Figura 7: Fluxograma de obtenção das farinhas de pinhão.	31
Figura 8: Imagem A: Farinha de pinhão cru processada. Imagem B: Farinha de pinhão cru antes da 2ª trituração.....	33
Figura 9: Imagem A: Farinha de pinhão cozido processada. Imagem B: Farinha de pinhão cozido antes da 2ª trituração.	33
Figura 10: Bebidas lácteas acidófilas produzidas para o pré-teste de avaliação do percentual a ser adicionado de farinha de pinhão no processamento.	46
Figura 11: Fluxograma de preparo dos iogurtes acrescidos de pinhão cru ou cozidos e de suas respectivas farinhas.....	48
Figura 12: Imagem A: iogurte produzido com farinha de pinhão cozido e células intactas. Imagem B: iogurte produzido com a farinha de pinhão cru e células intactas.....	52
Figura 13: Imagem A: iogurte com pinhão cozido e células lisadas. Imagem B: iogurte produzido com pinhão cru e células lisadas.....	53
Figura 14: Fluxograma de produção de queijos com adição de pinhão cozido e farinha de pinhão cozido.	75
Figura 15: Processo de produção de queijos acrescidos de farinhas de pinhão	76
Figura 16: Queijos acrescido de farinha de pinhão cozido.....	77
Figura 17: Imagem A: Semeadura dos micro-organismos nas placas. Imagem B: Placa com meio Muller Hilton Agar solidificado, contendo orifícios de 5 mm de diâmetro.	98
Figura 18: Placas apresentando halos de inibição frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	100

Lista de Tabelas

Tabela 1: Componentes Nutricionais da semente da <i>Araucaria angustifolia</i> segundo diferentes autores.	9
Tabela 2: Componentes fitoquímicos presentes em diferentes partes da <i>Araucaria angustifolia</i>	13
Tabela 3: Compostos e suas ações sobre micro-organismos.	16
Tabela 4: Resultados médios (%m/m) e erro padrão da composição química do pinhão <i>in natura</i> e das farinhas de pinhão cru e cozido.	36
Tabela 5: Resultados das avaliações microbiológicas das amostras de farinha de pinhão cru e cozido e do pinhão <i>in natura</i>	36
Tabela 6: Valores do pré-teste para leite fermentado acrescido de pinhão.	45
Tabela 7: Resultado do pH dos iogurtes durante 28 dias de avaliação.	56
Tabela 8: Resultado da acidez em % durante 28 dias de avaliação dos iogurtes.	56
Tabela 9: Resultados percentuais obtidos de umidade, cinzas, proteínas e viscosidade.	59
Tabela 10: Resultado em cm de sinérese em 28 dias de avaliação.	59
Tabela 11: Atividade antioxidante (%) das amostras de iogurtes avaliados pelo método DPPH.	61
Tabela 12: Resultado da contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	61
Tabela 13: Resultado das análises microbiológicas de iogurtes acrescidos de pinhão cru e cozido ou de suas farinhas.	62
Tabela 14: Valores médios e desvio padrão da atividade antioxidante nas amostras de iogurte.	62
Tabela 15: Média das notas da análise sensorial.	63
Tabela 16: Valores de pH em 21 dias de análise.	81
Tabela 17: Média dos valores da acidez titulável* de queijos acrescidos de farinha de pinhão cozido ou de pinhão cozido.	81
Tabela 18: Resultado médio dos teores de proteínas, umidade, extrato seco, lipídeos, cloretos, cinzas, fibras e carboidratos dos queijos, acrescidos de farinha de pinhão cozido ou pinhão cozido.	83
Tabela 19: Resultado da avaliação microbiológica dos queijos acrescidos de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido.	83

Tabela 20: Média das notas da análise sensorial dos queijos.	87
Tabela 21: Porcentagem de preferência da análise sensorial de queijo acrescido com 10% de pinhão cozido.	87
Tabela 22: Atividade antimicrobiana dos extratos de casca de pinhão.	99

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	- Análise de Variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	- Brain Heart Infusion
BP	- Baird parker
CONAB	- Companhia Nacional de Abastecimento
CONAMA	- Conselho Nacional de Meio Ambiente
dPas	- DeciPascal
DPPH	- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
EMB	- Eosina Azul de Metileno
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EAPC	- Extrato Aquoso de Casca de Pinhão Cru
EAPCZ	- Extrato Aquoso de Casca de Pinhão Cozido
EHCP	- Extrato Hidroalcoólico de Casca de Pinhão Cru
EHCPZ	- Extrato Hidroalcoólico de Casca de Pinhão Cozido
F	- QM tratamento / QM Resíduo
FPC	- Farinha de Pinhão Cru
FPCZ	- Farinha de Pinhão Cozido
GL	- Graus de Liberdade
HUOP	- Hospital Universitário do Oeste do Paraná
IAP	- Instituto Ambiental do Paraná
IBAMA	- Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUCN	- International Union for Conservation of Nature
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MSR	- Man, Rogosa e Sharpe Ágar
NCCLS	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
NMP	- Número Mais Provável
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PC	- Pinhão Cru <i>in natura</i>
PCZ	- Pinhão Cozido
PFNM	- Produtos Florestais Não Madeireiros

PGPM-Bio	- Política de Garantia de Preços Mínimos para a Sociobiodiversidade
q.s.	- Quantidade Suficiente
Qm	- Quadrado Médio
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RMF	- Resíduo Mineral Fixo
RS	- Amido Resistente
SDS	- Amido Lentamente Digestível
SPC	- <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SS	- Soma dos Quadrados
TACO	- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TEAC	- Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
UFC	- Unidades Formadora de Colônias

Lista de Símbolos

CaCl_2	- Cloreto de Cálcio
H_2SO_4	- Ácido Sulfúrico
N	- Normalidade
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
% (m/m)	- Porcentagem massa/massa
% (p/v)	- Porcentagem Peso/volume
Spp.	- Referência a várias espécies de um gênero.

1. Introdução

A constante busca por novos produtos alimentícios para atender uma boa parte da sociedade, que nos dias atuais está sempre em busca de diferentes produtos, é algo constante para todos os ramos da indústria. O desenvolvimento de alternativas para produtos já existentes abre um grande campo de novas descobertas. Levando em consideração estes fatores o uso do pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, vem de encontro a esta necessidade; tendo em vista que este é um alimento com grandes propriedades nutricionais, sem nenhum produto de uso industrial, além de apresentar a possibilidade de ser uma alternativa alimentar a pessoas portadoras de doença celíaca ou que buscam uma dieta mais nutritiva e diversificada.

Sua amêndoa/semente é rica em reservas energéticas, servindo para a alimentação humana de animais domésticos e da fauna silvestre. Também apresenta propriedades medicinais, sendo indicadas para combater azia, anemia, debilidades do organismo, entre outros benefícios; relatados pelo uso popular e passados de geração em geração. Apesar disto, talvez mais por falta de uma cultura industrial do que por dificuldades técnicas em seu processamento, esta matéria-prima não tem sido largamente empregada na indústria brasileira de alimentos como o são as outras amêndoas. Seu consumo mais usual é na forma assada ou cozida em pratos produzidos de forma artesanal, sem nenhum tipo de preparo ou envolvimento industrial.

O pinhão é um produto regional, típico do sul do Brasil, sendo de grande importância para uma grande parte da população que se beneficia de sua produção, não apenas como alimento, mas também como forma de sustento de suas famílias, através de sua venda. O presente estudo teve por objetivo desenvolver e avaliar comparativamente características composicionais, bem como caracterizações físico-químicas das farinhas obtidas a partir de pinhão cru e cozido, secos em estufas com temperaturas e umidades controladas, com o intuito de desenvolver um produto que possa ser consumido durante períodos mais longos e que mantenha as características nutricionais próprias deste alimento. Além disso, este trabalho se propôs a desenvolver um iogurte acrescido de polpa de pinhão ou de suas farinhas, que surja como uma alternativa nova para o mercado de alimentos lácteos, além de incentivar a utilização de um alimento que embora apresente grande consumo na região sul do país, é pouco pesquisado, utilizado e pode-se dizer desconhecido pela maioria dos brasileiros: o pinhão.

Foram desenvolvidas diferentes formulações de iogurtes acidófilas acrescidos de pinhão cru e cozido e das respectivas farinhas obtidas destes. Como resultado se obteve um produto final que surge como uma nova alternativa de alimentação probiótica saudável para os consumidores de alimentos lácteos.

No campo de desenvolvimento de novos produtos, este trabalho também realizou o desenvolvimento de um queijo frescal cremoso acrescido de pinhão, agregando valor nutricional e econômico e este novo produto. Gerando assim uma nova opção de queijo para o mercado consumidor.

Verificando que o uso do pinhão como alimento gera uma grande quantidade de cascas, que são resíduos de produção, e que não possui nenhum outro destino a não ser o descarte para decomposição na natureza, processo este que leva muito tempo para ocorrer, o presente trabalho se propôs a busca por alternativas para o uso da casca do pinhão após o consumo da polpa. Neste sentido foram desenvolvidos extratos aquosos e hidroalcoólicos produzidos a partir da casca do pinhão que passou por processo de cozimento e que não passaram por este processo. Os extratos obtidos foram liofilizados para melhor conservação e padronização destes, sendo em seguida avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana frente a diferentes classes de micro-organismos, buscando assim novas alternativas fitoquímicas para uso comercial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as características composicionais e físico-químicas do pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, caracterizando os componentes existentes nesta matéria-prima e verificando quais as possíveis aplicações para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios e farmacêuticos de suas diferentes partes.

2.2. Objetivos Específicos

Desenvolver farinhas de pinhão cozido e de pinhão cru e comparar as características físico-químicas e microbiológicas que possam existir entre os dois diferentes tipos de farinha e pinhão *in natura*.

Desenvolvimento de um iogurte acidófilo acrescido de pinhão e de suas farinhas, com atividade probiótica apresentando característica inovadora pela presença desta matéria-prima.

Determinação das características físico-químicas, bromatológicas, microbiológicas e sensoriais desta nova formulação de iogurte acidófilo desenvolvido, verificando se as mesmas se encontram dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação para este tipo de produto.

Avaliação da capacidade antioxidante do iogurte acidófilo, verificando se o mesmo apresenta concentrações que possam classificar este novo produto dentro desta categoria de alimentos.

Desenvolvimento de um queijo frescal cremoso acrescido de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido, avaliando as características bromatológicas e sensoriais deste novo produto com caráter inovador pela presença da matéria-prima pinhão em sua composição.

Determinação das características físico-químicas e microbiológicas desta nova formulação, verificando se as mesmas se encontram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Levando em consideração que um grande volume de cascas é produzido e descartado como resíduo, quando do consumo deste alimento, o presente trabalho se propõe ao desenvolvimento de extratos hidroalcoólicos e aquoso a partir da casca do pinhão (fruto), para avaliação da atividade antimicrobiana destes extratos sob diferentes micro-organismos.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Caracterização botânica

Araucária é um dos três gêneros que pertencem à família *Araucariaceae*, ocupando uma posição isolada em meio às coníferas. O gênero *Araucária* inclui dezenove espécies presentes em sua maioria na faixa geográfica que cobre a América do Sul até a Austrália e Ilhas do Pacífico. Apesar de a família *Araucariaceae* estar agora restrita ao hemisfério sul, evidências fósseis mostram que ocorreu anteriormente também na parte norte do globo (Branco et al., 2016; David & Silochi, 2010; Daudt, 2016; Guidolin et al., 2017; Peralta et al., 2016).

Pinho, Pinheiro-do-Paraná, Pinheiro-Caiová, Pinheiro das Missões, Pinheiro-São-José, Cori, Curi, Curiúva, Pino, Pinhão, Pinheiro, Pinheiro Araucária, Pinheiro Brasileiro, Pinheiro Cajuva, Pinheiro Chorão, Pinheiro Macaco, Pinho, Pinho Brasileiro, Pinho do Paraná, Araucária entre outros (Figura 1), são algumas das denominações pelas quais a *Araucaria angustifolia* é conhecida (Acorsi et al., 2009; Conab, 2014; Costa, 2017; Costa & Daudt, 2014; Forlin et al., 2009; Garcia et al., 2012; Leite, 2007; Lorenzi, 2000; Oliveira et al., 2015; Peralta et al., 2016; Souza, 2013). Esta espécie foi descrita pela primeira vez por Bertoloni em 1820 como *Columbea angustifolia* Bert. Depois, foi redescrito por Richard Rich como *Araucaria brasiliana* e retificada por Otto Kuntze como *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze (Branco et al., 2016), sendo esta a única espécie do gênero *Araucária* encontrada no Brasil de forma natural.



Figura 1: Floresta de *Araucaria angustifolia* na região sul do Brasil.

Fonte: <https://bibocaambiental.blogspot.com/2015/11/mata-da-araucaria.html>

É uma planta nativa da mata atlântica do sul do Brasil (Costa, 2017; Conab, 2014) distribuindo-se principalmente nos estados mais ao sul: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Koehnlein et al., 2012) (Figura 2). Crescem em altitudes superiores a 500 m acima do nível do mar e atingem bom desenvolvimento em 50 anos, com média de vida variando entre 200 e 300 anos. Tolerante a baixas temperaturas, possui adaptabilidade fisiológica à mudança de condições ambientais de luz e sombra (Branco et al., 2016).

É uma planta dióica, ou seja, há árvores femininas e masculinas, com predominância de pinheiros masculinos, com um longo ciclo reprodutivo, sendo que a primeira florada ocorre em média aos 15 anos, em planta cultivada isoladamente, e 20 anos, nas populações naturais. A floração feminina ocorre o ano todo, enquanto a masculina, de agosto a janeiro (Conab, 2014; Lorenzi, 2000).

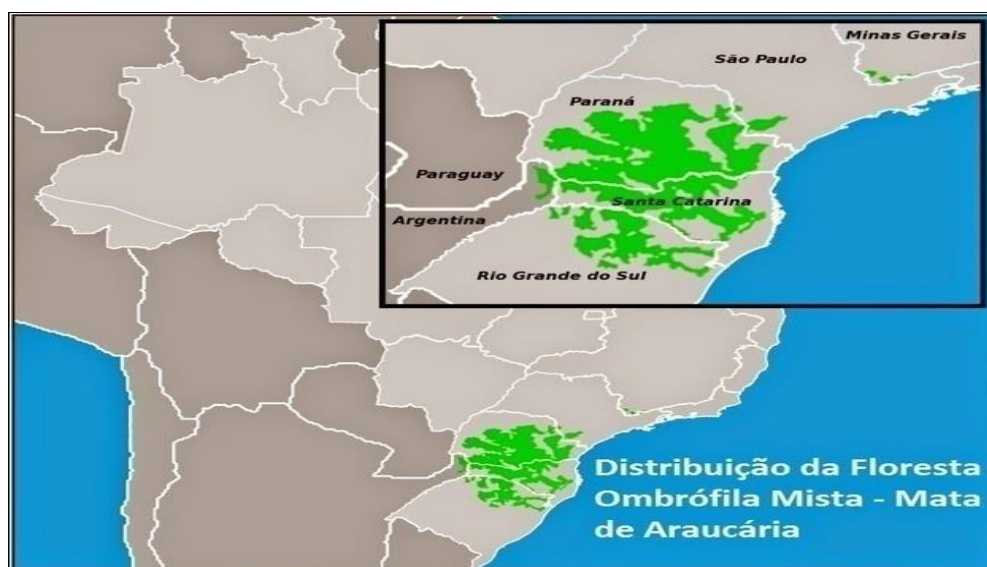


Figura 2: Distribuição geográfica da *Araucaria angustifolia* na região sul do Brasil.

Fonte: <https://bibocaambiental.blogspot.com/2015/11/mata-da-araucaria.html>

Raramente apresenta regeneração natural na floresta onde vive. Como não tolera sombra, ali o crescimento é lentíssimo, e as plantas são raquíticas. Mas pode, com frequência, colonizar o campo. O pinheiro cresce melhor sob precipitação bem repartida e temperaturas mais suaves (médias em torno de 20 a 21°C durante o verão e de 10 a 11°C durante o inverno) aceitando algumas variações (Rizzini, 1986).

A produção de mudas ocorre com melhor eficácia se for realizada logo após a colheita das sementes, devendo ser colocadas para germinação em recipientes individuais. A emergência ocorre em alguns dias e a taxa de germinação é alta com sementes novas (Lorenzi, 2000).

3.2. Planta

O pinheiro é uma árvore que atinge até 50 m de altura, com diâmetro de 1 a 3 m, tronco reto, casca resinosa e grossa. Ramos dispostos em verticilos que vão diminuindo de distância para o alto, ramos secundários agrupados no ápice dos primários (Hatschbach & Ziller, 1995; Peralta et al., 2016). De acordo com Lorenzi (2000), a árvore jovem tem forma piramidal e bem diferente da adulta, podendo ser considerada como uma árvore extremamente ornamental, podendo ser empregada no paisagismo. Quando atinge a idade adulta, a copa atinge forma de taça devido à perda natural dos ramos inferiores (Peralta et al., 2016).

O tronco apresenta uma cor castanho purpúrea, com casca exterior áspera e uma casca interna que é resinosa e esbranquiçada. A espessura da casca pode variar de 2 a 15 cm conforme a idade da planta podendo chegar a um diâmetro de 40 cm, com aspecto esponjoso, apresentando placas e anéis grossos e deprimidos a espaços mais ou menos regulares (antigos nós). À medida que o tempo passa, a casca externa (casca morta) é naturalmente descartada pela árvore, que pode viver 200 anos em média.

Suas folhas são aciculares verde-escuro (em forma de agulha) que permanecem em anexo sob a árvore por muitos anos e podem atingir até 6 cm de comprimento e 1 cm de largura. Se apresentam oval-lanceoladas, truncadas na base, atenuadas na direção do ápice, que é bem agudo e pungente, coriáceas, duras, côncavas, voltadas para a ponta dos ramos, razão por estes parecerem cilindros verdes, medindo entre 25 e 60 mm por 8 a 25 mm (Branco et al., 2016; Hatschbach & Ziller, 1995; Rizzini, 1986).

Sua madeira apresenta coloração amarelada ou alvacentas, às vezes, com tonalidade rósea ou levemente pardacenta, uniforme, com superfície lustrosa e lisa, cheiro e sabor ligeiramente resinoso. Leve e macia, pouco durável quando exposta ao tempo, densidade de $0,55\text{g/cm}^3$ (Lorenzi, 2000; Rizzini, 1986).

As flores femininas (Figura 3) apresentam-se como estróbilo, mais conhecido como pinha, com forma globular ou ovóide. A pinha é formada pelas sementes (pinhões), eixo central e brácteas (sementes não desenvolvidas), estreitamente sobrepostas e inseridas em um eixo central cônico (Souza, 2013). De acordo com Branco et al. (2016), o cone fecundado pode medir 10 a 25 cm de diâmetro e pesar até 4,7 kg, contendo mais de 1.000 elementos, incluindo sementes e brácteas. A ocorrência de brácteas é cerca de cinco vezes maior que as sementes férteis.

Os estróbilos machos (Figura 3) são alongados, cilíndricos, densos e cobertos

por escamas, que se organizam em espiral. As escamas da base são abertas para permitir a liberação de pólen e sua disseminação e ambos estróbilos se desenvolvem durante o verão (Branco et al., 2016).

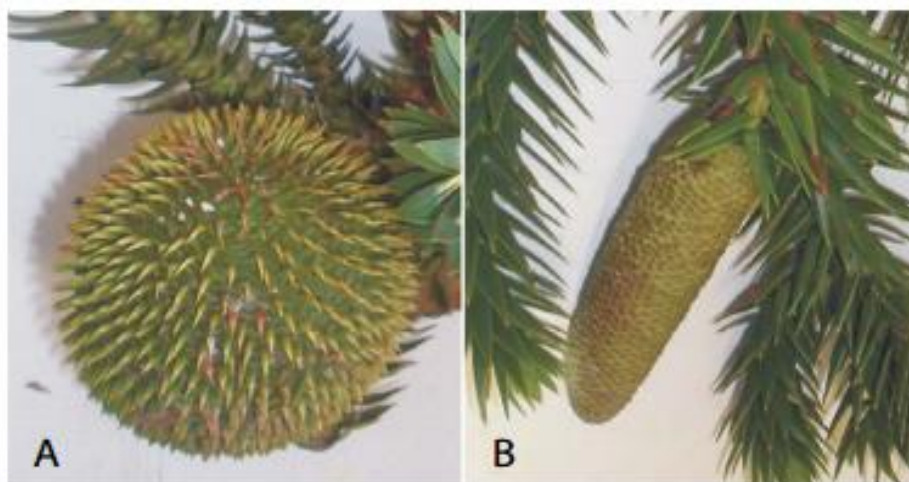


Figura 3: *Araucaria angustifolia*: Estróbilo fêmea (A) e macho (B).

Fonte: Fotografados por Cátia S. Branco em Branco et al. (2016).

A polinização ocorre nos meses de outubro a dezembro, sendo realizada predominantemente pelo vento, sendo que dois anos após, as pinhas amadurecem (Conab, 2014; Lorenzi, 2000; Macedo et al., 2016; Souza, 2013).

Algumas espécies de animais auxiliam na reprodução da Araucária, como por exemplo, a ave gralha-azul (*Cyanocoraxcaeruleus*), que ao esconder suas sementes no solo para posterior consumo acaba, involuntariamente, plantando-a (Costa, 2017). Estudo realizado por Reinert & Bornschein (1998), comprovou que os pinhões fazem parte da dieta da gralha-azul. Por este motivo é considerada ave símbolo do estado do Paraná protegido pela Lei Estadual Nº. 7957 de 12 de novembro de 1984, no Artigo 1º, sendo considerada como um animal de grande importância para a preservação do pinheiro (PARANÁ, 1984).

3.3. Semente

A semente da Araucária é o pinhão, apresentando-se com 3 a 8 cm de comprimento, por 1 a 2,5 cm de largura e peso médio de 8,7 g (Acorsi et al., 2008; Leite, 2007; Forlin et al., 2009; Peralta et al., 2016). Com forma cônico-arredondada, são carnosos e bastante apreciados na culinária do sul do País (Souza, 2013). O envoltório ou casca (tegumento) do pinhão é a parte externa que protege a amêndoa e é composta por três camadas, a externa, a mediana e a interna, possuindo

coloração de amarelo ao marrom avermelhado, branco amarelado ao marrom e de marrom ao rosa avermelhado, respectivamente. As camadas, externa e mediana, dispõem-se longitudinalmente e conferem maior resistência às sementes, assemelhando-se a madeira, conforme demonstrado na Figura 4 (Costa & Daudt, 2014). As cascas das sementes correspondem a, aproximadamente, 30% do peso total do fruto (Oliveira et al., 2015). Já o envoltório interno é mais fino e membranáceo (Costa, 2014).

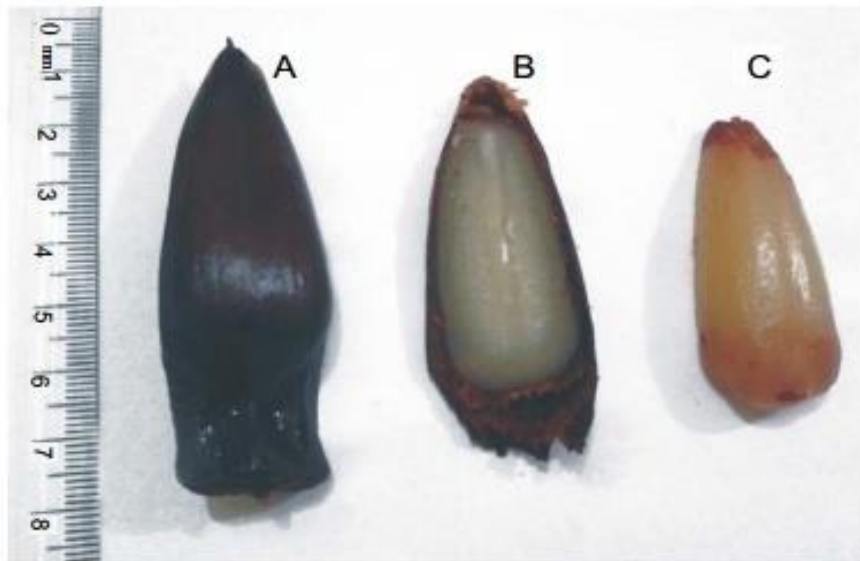


Figura 4: Sementes cozidas de *Araucaria angustifolia* (pinhão) mostrando revestimento externo (A), seção longitudinal exibindo embrião (B) e porção comestível interna (C).

Fonte: Branco et al. (2016).

A amêndoa é a parte comestível, é muito dura quando crua, necessitando 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 (Capella et al. 2009).

É um produto sazonal encontrado principalmente entre os meses de abril e agosto (Branco et al., 2016; Polet, 2014). É colhido e consumido durante o inverno, temporada onde apresenta uma boa qualidade sensorial (Guidolin et al., 2017).

O método de colheita é rudimentar e, como a árvore é alta, muitas vezes, os pinhões não são colhidos diretamente, mas sim, recolhidos do chão (Daudt, 2016). A Figura 5 mostra a árvore Araucária e sua semente, o pinhão, dentro de uma pinha.



Figura 5: Araucária (a) e pinha com os pinhões (b).

Fonte: Campestrini (2011) (a) e Verdi (2010) (b), adaptado de Daudt (2016).

Dentre os componentes majoritários do pinhão (Tabela 1), destacam-se os carboidratos, os quais incluem a fração fibra. O consumo de fibras alimentares está associado com resultados benéficos para o organismo humano e mesmo para prevenção de algumas doenças crônicas. Quanto ao seu valor nutricional, o pinhão é considerado uma fonte de amido, fibra dietética e também de micronutrientes como cobre e magnésio, além de possuir baixo índice glicêmico. Estudos também encontraram propriedades antioxidantes do pinhão, sendo encontrados pelo menos três compostos fenólicos, além de ácido cítrico. Em relação ao seu teor protéico foi verificado que a maior parte das proteínas encontradas são albuminas, que possuem um valor nutritivo elevado, semelhante à soja (Branco et al., 2016; Daudat et al., 2014; Guidolin et al., 2017; Koehnlein et al., 2012; Polet, 2014).

Tabela 1: Componentes Nutricionais da semente da *Araucaria angustifolia* segundo diferentes autores.

Autoria Ano de Publicação	Parte da planta utilizada	Nutriente
Branco et al. (2016)	Sementes cozidas	Carboidratos Cobre Fração fibra – fibra dietética Magnésio
Branco et al. (2016)	Sementes	Albuminas Amido Cálcio Ferro Histidina - aminoácidos limitantes Lisina -aminoácidos limitantes Magnésio Potássio

		Proteínas Zinco
Cordenunsi et al., (2004)	Sementes	Amido Fósforo
Corrêa & Helm (2010)	Sementes	Ácidos graxos
Koehnlein et al. (2012)	Sementes	Albuminas Amido Carboidratos Cobre Fração fibra – fibra dietética Magnésio
Polet (2014)	Sementes	Albuminas Aminoácidos aromáticos Aminoácidos contendo enxofre Carboidratos Cobre Fração fibra – fibra dietética Globulinas Magnésio Valina – proteínas

Segundo Corrêa & Helm (2010) o pinhão apresenta quantidades significativas de minerais e ácidos graxos. Além disso, possui amido resistente (RS) e amido lentamente digerível (SDS) conhecidos por liberarem glicose a uma taxa lenta e exibir uma baixa resposta glicêmica, reduzindo o risco de diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer de cólon. Assim, o pinhão é considerado um alimento saudável, podendo também constituir um ingrediente para a produção de diferentes alimentos (Guidolin et al., 2017).

3.4. O Pinhão como alimento

O pinhão, que constitui a amêndoa da Araucária, é rico em reservas energéticas, servindo para a alimentação humana, de animais domésticos (principalmente suínos) e da fauna silvestre. (Acorsi et al., 2008; David & Silochi, 2010; Garcia, 2012).

Apesar do grande consumo, talvez mais por falta de uma cultura industrial do que por dificuldades técnicas em seu processamento, o pinhão não é muito empregado na culinária brasileira como o são outras amêndoas.

Seu consumo mais usual é na forma assada ou cozida (Santos et al., 2002). Para o consumo, as sementes são geralmente cozidas em água ou torradas. As farinhas de pinhão cru ou cozido (preparadas artesanalmente) são utilizadas na preparação de vários pratos como bolos, pães e biscoitos (Peralta et al., (2016)

O pinhão pode ser considerado uma ótima fonte alternativa de amido. O uso do amido de pinhão no Brasil oferece a vantagem de apoiar o uso de um produto regional que é protegido por leis ambientais e que muitas vezes acaba sendo desperdiçado devido ao armazenamento inadequado, colheita rudimentar ou excesso de produção (Daudt et al., 2014), além, da inexistência de uma cultura industrial para este produto.

3.5. Pinhão na Medicina

O pinhão também apresenta propriedades medicinais, sendo indicado para o combate da azia, da anemia e a debilidade do organismo (Acorsi et al., 2008; Carvalho, 2002).

Por ser rico em fibras, o consumo de pinhão pode trazer diversos benefícios, como prevenir doenças intestinais. O pinhão é composto por vários minerais como cobre, zinco, manganês, ferro, magnésio, cálcio, fósforo, enxofre e sódio. Porém, merece destaque no fornecimento de potássio, mineral que ajuda a controlar a pressão arterial. Ainda no pinhão, são encontrados os ácidos graxos linoleico (ômega 6) e oleico (ômega 9). Estes contribuem para a redução do colesterol no sangue. Por isso, podem ajudar na prevenção de doenças cardiovasculares (EMBRAPA, 2018).

O cozimento das folhas é eficiente contra a anemia e tumores que surgem devido às disfunções dos gânglios linfáticos- escrófulas (Carvalho, 2002). A casca em infusão no álcool cura cobreiros, reumatismo, varizes e distensões musculares. O nó, a casca do caule e os brotos são usados na medicina popular pelos índios de várias etnias do Paraná e de Santa Catarina nas afecções do reumatismo, dores causadas por quedas durante a gravidez, machucado nos olhos, catarata, cortes, feridas, dor nos rins e doenças venéreas (Marquesini, 1995).

Estudos demostram que extratos metanólicos de pinhão apresentam quantidades significativas de catequina e quercetina, flavonóides com importante atividade antioxidante (Giazzon et al., 2009).

3.6. Compostos Fitoquímicos Funcionais

Segundo Cordenunsi et al. (2004), na semente, compostos fenólicos podem migrar do revestimento interno para a polpa durante o processo de aquecimento, e, portanto, quantidades significativas de catequina e quercetina podem ser

encontradas na semente cozida. Resultados semelhantes foram relatados em outro estudo, mostrando diferenças entre extratos obtidos de sementes cozidas e cruas em relação aos flavonóides ($11,89 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mg}$ em sementes cozidas e $1,16 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ em extrato de sementes cruas) e proantocianidinas ($40,70 \pm 0,59 \mu\text{g}/\text{mg}$ em sementes cozidas e $0,45 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ em extratos de sementes cruas) (Koehnlein et al., 2012).

Koehnlein et al., (2012), descreve que os compostos polifenólicos são metabólitos secundários das plantas, sendo importantes para a saúde humana porque eles têm potenciais benéficos em doenças cardiovasculares e câncer, possivelmente associado às suas propriedades antioxidantes (Daudt et al., 2014). Sendo este mais uma alternativa para a utilização desta matéria-prima na fabricação de diferentes produtos.

Estudos demonstram que as brácteas (sementes estéreis) contêm níveis elevados de compostos químicos, como 3-glucosidedihidroquercetina, Amentoflavona 4', 4'', 7,7''-tetrametil, Apigenina, Catequina, Epicatequina, Quercetina e Rutina, com importantes ações farmacológicas em vários modelos de estudo (Branco et al., 2016).

Alguns estudos científicos realizados com Araucária demonstraram que a casca da árvore apresenta alta concentração de flavonóides e atividade antioxidante em microsomas e fibroblastos de ratos. Além disso, as folhas dessa árvore contêm proantocianidinas e biflavonóides e apresentaram atividade anti-herpes, também foram capazes de reduzir danos oxidativos a lipídios e DNA em diferentes sistemas *in vitro* (Sousa, 2013).

Os flavonóides mais comuns encontrados na Araucária são catequina e epicatequina que são flavan-3-ols (derivados de flavanos que usam a estrutura 2-fenil-3,4-diidro-2H-cromen-3-ol), a subclasse mais complexa de flavonóides. Esta subclasse varia de monômeros simples a oligoméricos e polímeros, proantocianidinas, que também são conhecidas como taninos condensados. A quercetina é um flavonol, enquanto a apigenina é uma flavona (Branco et al., 2016). Na Tabela 2 estão descritos alguns dos principais princípios ativos encontrados na *Araucaria angustifolia*.

Tabela 2: Componentes fitoquímicos presentes em diferentes partes da *Araucaria angustifolia*.

Autoria Ano de publicação	Parte da planta estudada	Princípio ativo presente
Cordenunsi et al. (2004)	Sementes cozidas	Catequina Quercetina
Koehnlein et al. (2012)	Sementes cozidas	Ácido gálico Catequinas Quercetina
Koehnlein et al. (2012)	Extratos sementes crua e cozida	Flavonóides Proantocianidinas - taninos condensados
Koehnlein et al. (2012)	Sementes	Ácido cítrico Compostos fenólicos
Branco et al.(2016)	Sementes	Ácido gálico Lecitinas N-acetil-D-glucosamina
Polet (2014)	Sementes	Ácido cítrico
Conab (2014)	Madeira	Breu Terebintina
Sousa (2013)	Folhas	Biflavonóides Proantocianidinas
Branco et al.(2016)	Folhas	Ácido para-cumárico Ácidos diterpênicos E e Z Amentoflavone Apigenina – flavona Bilobetina Catequina Cupressuflavona Ent-kaureno Epicatequina Esteróides Ginkgetin Il-7-O-metil-robusta flavona Mono-, di-, tri- e tetra- omethylamentoflavone Phyllocladene Polifenóis Quercetina Terpenoides <i>β-Sitosterol</i>
Sousa (2013)	Casca da planta	Flavonóides
Branco et al.(2016)	Casca da planta	Ácido benzóico Ácido gálico Ácido p-hidroxibenzoico Ácido protocatequico Antocianidinas Catequinas - flavan-3-ols Epiafzelechin p- hidroxibenzoato

		Epiafzelechin protocathechuate Epicatequinas - flavan-3-ols Flavonas – apigenina Flavonoides Isoflavonas Piroresinol- eudesmina Quercitina – flavonol Sitosterol Sugiol
Branco et al.(2016)	Brácteas	3-glucosidedihidroquercetina Ácido quinico Amentoflavone 4', 4'', 7,7' - tetrametil Apigenina Catequina Epicatequina Éter Quercetina Rutina
Branco et al.(2016)	Nó	Isolariciresinol Isolariciresinol-4'-methyl ether Lariciresinol Lariciresinol-4-metil éter Pinoresinol Secoisolariciresinol Secoisolariciresinol monometil éter
Branco et al.(2016)	Resina do nó	2,3-bis- (p-hidroxifenil) -2- ciclopenteno-1-ona <i>4,4'-di-hidroxi chalcona</i> <i>Criptoresinol - neolignana</i> Éter monometílico de pinoresinol Hinokiresinol – ligano Isolariciresinol Secoisolariciresinol – lignano
Branco et al.(2016)	Resina árvore	4-hidroxibenzaldeído Ácido p-cumárico Ferruginol - diterpeno Hidroquinona <i>Lignanós – polifenóis</i>
Garcia (2012)	Resina árvore	Acetona Ácido pirolenhoso
Branco et al.(2016)	Casca da semente	Proantocianidinas - taninos condensados
Cordenunsi et al. (2004)	Casca da semente	Quercitina
Koehnlein et al. (2012)	Casca da semente	Quercitina

Apesar de alguns estudos farmacológicos terem sido realizados nesta planta, há uma história notável de uso medicinal por populações nativas que fazem uso de infusões de folhas, cascas e nós sendo estes usados para tratar anemia, estirpes

musculares, reumatismo, varizes, doenças renais e doenças sexualmente transmissíveis. Além disso, um xarope produzido a partir de sua resina é usado para tratar infecções do trato respiratório, indicando uma versatilidade terapêutica nos usos empíricos da Araucária. Infusões de folhas são usadas como emoliente, anti-séptico, contra infecções respiratórias, reumatismo, fadiga e anemia, e corantes são usados para o tratamento de feridas e erupções causadas pela herpes (Branco et al., 2016; Peralta et al., 2016).

Em trabalho realizado por Klein et al. (2015) foi comprovado que extratos da casca de pinhão que foram previamente autoclavados não apresentam ação antifúngica frente a culturas de *Bipolaris curvispora*, *Bipolaris cynodontis*, *Bipolaris oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus* e bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. Esses resultados podem ser creditados ao fato de que alguns micro-organismos como *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* podem crescer na presença de taninos e seus monómeros e dímeros, tendo a utilização destes compostos como uma fonte de carbono (Scalbert, 1991). Já a estrutura da membrana externa de bactérias Gram-negativas tem a capacidade de protegê-las de muitos antimicrobianos, conferindo maior resistência do que as bactérias Gram-positivas (Klein et al., 2015).

Extratos de casca de pinhão apresentam atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Clostridium perfringens* (Klein et al., 2015). Esta ação sobre o crescimento de bactérias está relacionada a taninos presentes na casca do pinhão, que afetam o crescimento de bactérias por diferentes mecanismos, como a inibição de enzimas extracelulares, complexação de íons metálicos essenciais para o metabolismo celular ou por ação direta na membrana celular (Serrano et al., 2009).

Na Tabela 3 estão descritas algumas atividades já comprovadas por diferentes autores de compostos químicos que são encontrados na *Araucaria angustifolia*.

Tabela 3: Compostos e suas ações sobre micro-organismos.

Composto químico	Antimicrobiana	Antifúngica	Antiviral
Proantocianidinas ^{1, 5}	Sim	-	Sim
Taninos condensados ¹	Sim	-	Sim
Lignanas ²	-	-	Sim
Biflavonas ³	-	Sim	Sim
Biflavonóides ⁴	-	-	Sim
Lectina ⁴	Sim	-	-

1 (Esquenazi, 2002; Santos & Mello, 2002); 2 (Ohashi et al, 1992; Castro et al, 1996; Saarinen et al, 2002); 3 (Parveen et al., 1987; Lin et al, 1999; Grynberg et al, 2002). 4 (Branco et al., 2016).

3.7. Importância econômica

A comercialização do pinhão praticamente se restringe aos meses de produção (abril a junho, podendo se estender até agosto). Apenas as árvores femininas geram a pinha, em cujo interior encontram-se os pinhões (Conab, 2014).

A safra anual ocorre no início do inverno e como não é consumida totalmente costuma ser destinada à alimentação animal o que indica um excedente de pinhão ao final das safras. No censo agropecuário realizado em 2006, o percentual de perda entre colheita e pinhões vendidos foi acima de 12% (IBGE, 2006). Esta grande quantidade de perda de matéria-prima se deve ao pouco uso industrial do pinhão.

Na Araucária tudo pode ser aproveitado desde as amêndoas/sementes, contidas no interior das pinhas, principal produto comercial, que são ricas em amido, proteínas e gorduras, constituindo um alimento bastante nutritivo, até a resina que, destilada, fornece o alcatrão. Da sua madeira obtém-se a pasta de celulose que, após uma série de operações industriais, dá origem ao papel. Por fim, gera ainda diversos óleos tais como a terebentina e o breu, utilizados em variadas aplicações industriais (Conab, 2014).

A Araucária já foi um dos mais importantes produtos da exportação brasileira, especialmente em função da elevada qualidade da sua madeira (Costa & Daudt, 2014), para uso em construções, serrarias e produção de celulose e papel, além do uso ornamental da árvore. Os galhos, refugos e o nó de pinho servem para lenha e combustível de caldeiras. Sua resina é utilizada na fabricação de vernizes, terebentina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos (Garcia, 2012).

Segundo dados de Dorneles (2015), em 2013 o Paraná obteve uma receita gerada pelo pinhão de R\$ 8,2 milhões, com uma produção de 3,9 mil toneladas. A

região sul do estado, que abrange os núcleos de Curitiba, Guarapuava, Irati, Laranjeiras do Sul, Paranaguá, Ponta Grossa e União da Vitória, respondem por mais de 80% da produção total do estado.

A exploração e comercialização do pinhão no Paraná são regulamentadas pela Portaria IAP Nº 46 de 26 de março de 2015, que institui os procedimentos para controle da exploração do pinhão e define outras providências (Paraná, 2015).

3.8. Usos comerciais

Uma das vertentes para a valorização do pinhão refere-se ao seu processamento que permite estender o período de oferta do produto, bastante limitado pelo baixo grau de industrialização (Conto & Ide, 2015; Cornejo et al., 2014).

De acordo com Conab (2014) a cadeia extrativa do pinhão é bastante simplificada, não sendo verificado nenhum processo industrial, diferentemente do que acontece com outras amêndoas. Possivelmente esse é um dos maiores obstáculos à comercialização de um volume maior deste produto, tendo em vista a reduzida quantidade de uso de técnicas de conservação e industrialização, que se restringe (em raríssimos casos) ao uso de câmaras de refrigeração na conservação pós-colheita do pinhão.

A perecibilidade do pinhão, aliada à falta de industrialização e à sazonalidade de produção (normalmente de março a julho) faz com que sua comercialização seja feita quase que totalmente *in natura* e na região de produção. Para mudar esta realidade é necessário implantar uma estrutura de armazenamento em câmaras frias, a temperatura de 2°C e umidade relativa de $90 \pm 2\%$ (Amarante et al., 2007), desenvolver técnicas de industrialização do pinhão e intensificar a divulgação do pinhão como alimento nutritivo. Isto favoreceria a comercialização também fora da época de colheita e o acesso a mercados consumidores fora da área de ocorrência da floresta com Araucária, para obter um maior valor agregado, com aumento da renda das famílias envolvidas no extrativismo e produção (Danner et al., 2012).

Segundo Conto & Ide (2015), normalmente, o pinhão é consumido cozido ou assado, porém a sua industrialização é quase nula devido à falta de uma cultura industrial das regiões produtoras e por sua sazonalidade.

O uso do pinhão na culinária brasileira está longe de ser difundido e intenso devido à falta de métodos para preservá-lo fresco e para processamento industrial. Assim, técnicas de conservação e uso sustentável têm sido investigadas para

encorajar a preservação e comercialização durante e fora da temporada de produção (Peralta et al., 2016).

A carência de produtos elaborados com pinhão constitui um dos principais entraves da cadeia produtiva desta espécie, sendo de suma importância o desenvolvimento e a disponibilização de produtos de maior valor agregado (Cornejo et al., 2014).

Na Figura 6 estão descritos alguns usos de produtos derivados da *Araucária*.

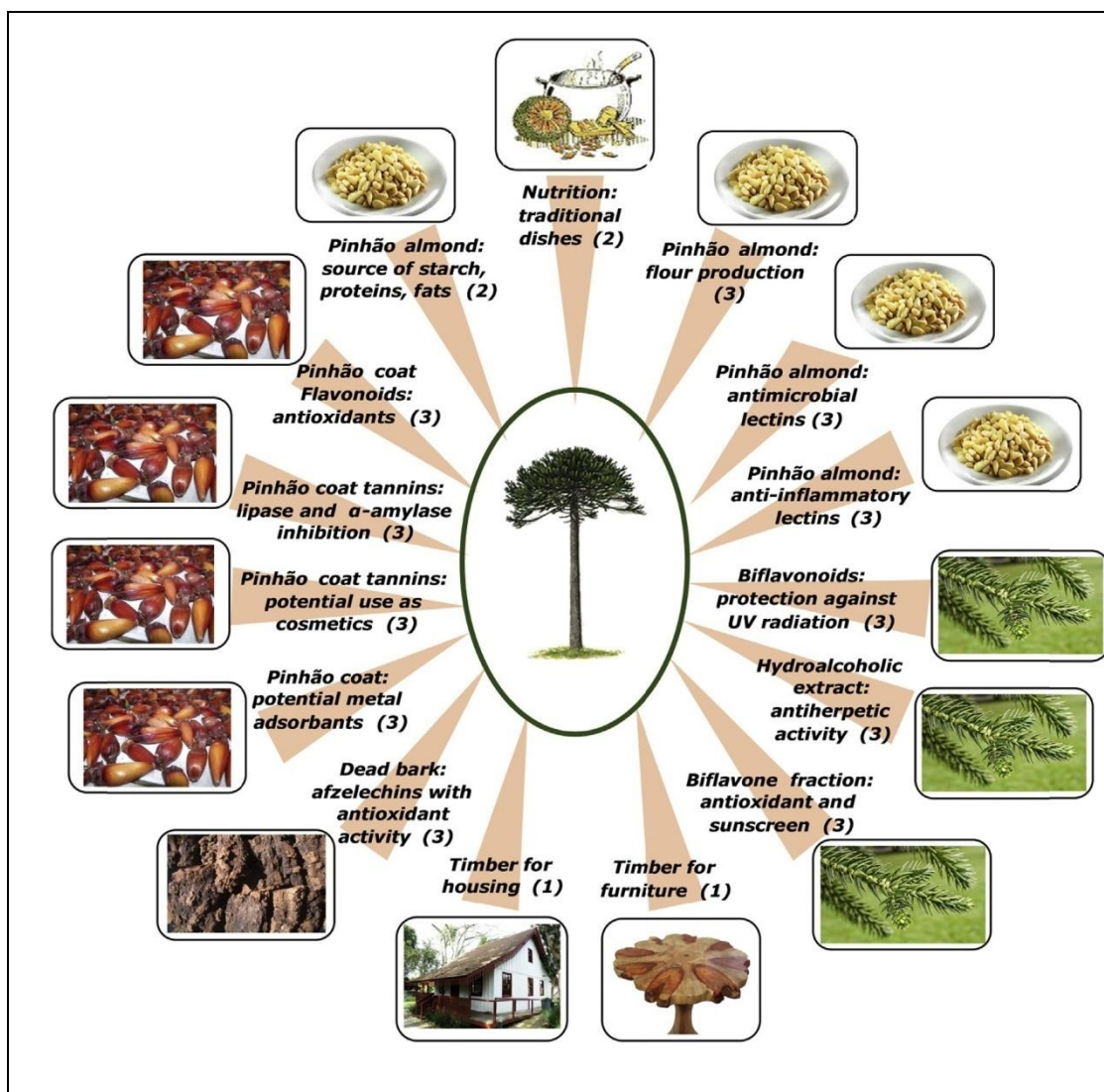


Figura 6: Usos de produtos derivados de *Araucaria angustifolia*:

(1) Passado (madeira para habitação e madeira para móveis); (2) Presente (amêndoa de pinhão: fonte de amido, proteínas, gorduras; nutrição: pratos tradicionais); (3) Futuro (Flavonóides da casca do pinhão: antioxidantes, taninos da casca do pinhão: inibição de lipase e α -amilase, taninos da casca do pinhão: uso potencial em cosméticos; Casca do pinhão: potencial absorvente de metais; Casca morta: Afzelequina com atividade antioxidante; Amêndoa do pinhão: lectinas antimicrobianas; Amêndoa do pinhão: lectinas antiinflamatórias; Biflavonóides: proteção contra radiação UV; Extrato hidroalcoólico: atividade anti-herpética; Fração flavonóide: antioxidante e protetor solar.

Fonte: Peralta et al., (2016).

3.9. Extinção

Esta árvore não possui apenas valor comercial, mas também cultural, uma vez que faz parte da tradição do povo, tanto nas histórias populares quanto na culinária (Costa, 2014). O pinhão possui um relevante aspecto social ligado às famílias de baixa renda e à agricultura familiar da região sul do Brasil, que o utilizam como fonte de alimento e incremento de renda durante os meses produtores (Conto & Ide, 2012), por este motivo a partir de 2014, este produto foi incluído na Política de Garantia de Preços Mínimos para a Sociobiodiversidade (PGPM-Bio), o que permite o pagamento de subvenção aos produtores extrativistas, caso o preço de venda por parte dos produtores extrativistas alcance valores inferiores ao preço mínimo estabelecido pelo Governo Federal.

É o primeiro produto da Região Sul do país a fazer parte da PGPM-Bio, se inserindo no contexto das políticas de apoio à conservação da Araucária, espécie que teve exploração intensa e desordenada e cuja existência vem sendo ameaçada pelo corte e pela expansão da agricultura, da pecuária e das florestas comerciais de pinus (*Pinus elliottii*), situação esta que tem relação direta com a sobrevivência de numerosas espécies de animais que se alimentam do pinhão (Branco et al., 2016; Conab, 2014).

O pinhão é considerado um dos principais Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNM) do estado do Paraná, logo após a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), tanto em termos de nível de produção como do valor da produção. Não há um número exato de pessoas envolvidas na coleta e comercialização do pinhão no estado, entretanto se destacam sua importância alimentar e fonte de renda para coletores e produtores rurais (Bittencourt et al., 2015).

Estava em trâmite na Câmara dos Deputados um Projeto de Lei N.º 6.914, de 2017, que previa a Instituição de uma Política Nacional de Incentivo ao Manejo Consciente e de Qualidade da Araucária. Com objetivo de viabilizar a retirada do Pinheiro Brasileiro ou Pinheiro-do-Paraná da lista de espécies da flora nacional ameaçadas de extinção, por meio do incentivo ao seu manejo consciente e de uma produção sustentável e de qualidade, que propicie a renovação da espécie em áreas de cultivo comercial e em áreas de conservação, com a preservação de seus recursos genéticos, esta proposta foi temporariamente retirada de pauta pelo autor da mesma podendo voltar à votação em breve (BRASIL, 2017).

Esta árvore foi muito explorada pela qualidade de sua madeira a ponto de ser incluída na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção do

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) (BRASIL, 1992). A ameaça de extinção ocorreu devida principalmente à devastação sofrida no final do século XIX, relacionada ao alto valor de sua madeira, à falta de gestão ambiental contra a exploração e ao mecanismo reprodutivo longo e delicado dessa espécie, o que torna difícil a sua regeneração natural (Costa, 2014).

As áreas remanescentes da espécie somam, atualmente, cerca de 2 a 5% da área original que era de 200.000 km² originais, entrando para a Lista Vermelha de Espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (Garcia, 2012; Macedo et al., 2016; Peralta et al., 2016). Segundo Oliveira et al. (2015) esta planta que já foi bastante abundante no sul do Brasil, ainda é um componente importante de sua flora. Para garantir a preservação das espécies ameaçadas de extinção o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) criou a Resolução 278/01 (BRASIL, 2001) que proibiu o corte e a exploração das espécies que constam nesta lista oficial, entre elas a *Araucaria angustifolia*.

Por este motivo Daudt (2016), afirmou que o uso do pinhão em pesquisas que enfatizem o uso sustentável pode auxiliar os esforços de conservação encorajando o uso racional e o consumo moderado da espécie.

4. Referências bibliográficas

1. Acorsi, D.M., Bezerra, J.R.M.V., Barão, M.Z., Rigo, M. Viabilidade do processamento de biscoitos com farinha de pinhão. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**. V. 5 N. 2 Maio/Agosto, Guarapuava, PR, 2009.
2. Amarante, C. V. T., Mota, C. S., Megguer, C. A., Ide, G. M. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.346-351. Santa Maria, RS, 2007.
3. Bittencourt, A.M., Santos, A.J., Ribeiro, R.M. A renda do pinhão nas propriedades rurais da região sudeste do Paraná. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.11 n.21. Goiania, GO, 2015.
4. Branco, C. S., Rodrigues, T.S., Lima, E. D., Calloni, C., Scola, C., Salvador, M. Chemical Constituents and Biological Activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **Journal of Organic & Inorganic Chemistry**. Vol. 2 No. 1: 1, 2016.
5. BRASIL. Portaria nº 37, de 03 de abril de 1992. IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Reconhece como lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção a relação que apresenta. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 de abril de 1992.
6. BRASIL. Resolução nº 278, de 24 de maio de 2001. CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre o corte e a exploração de espécies ameaçadas de extinção da flora da Mata Atlântica. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de maio de 2001.
7. BRASIL. **Câmara dos Deputados**. Institui a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Consciente e de Qualidade da Araucária. Retirado pelo Autor Evair Vieira de Melo - PV/ES em 15 de fevereiro de 2017.
8. Campestrini, S. **Flora Digital do Rio Grande do Sul: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. Acesso em: 30 de maio de 2018.

9. Capella, A.C.V., Penteado, P.T.P.S., Baldi, M.E. Semente de *Araucaria angustifolia*: Aspectos Morfológicos e Composição Química da Farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos – CEPPA**. v. 27, n. 1, p. 135-142, janeiro/junho, Curitiba, PR, 2009.
10. Carvalho, P.E.R. Pinheiro-do-Paraná. **Circular Técnica 60**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – EMBRAPA. Colombo, PR, 2002.
11. Castro, M.A., Gordaliza, M., Del Corral, J.M.M., Feliciano, A.S. The distribution of lignanoids in the Order Coniferae. **Phytochemistry**. v. 41, n. 4, p. 995-1011, Nantes, France, 1996.
12. CONAB (Brasil). Companhia Nacional de Abastecimento. **Pinhão (semente). Conjuntura Especial**. Setembro, Brasília, DF, 2014.
13. Conto, L.C. & Ide, G.M. Avaliação físico-química e sensorial de conservas de pinhão (*Araucaria angustifolia*) processadas em diferentes meios de acidificação. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**. V.11 n.2 Janeiro/Abril, Guarapuava, PR, 2015.
14. Cordenunsi, B.R., Menezes, E.W., Genovese, M.I., Colli, C., Souza, A.G., Lajolo, F.M. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 52, 3412–3416, São Paulo, SP, 2004.
15. Corrêa, M.F. & Helm, C.V. Caracterização da composição nutricional do pinhão in natura e cozido (*Araucaria angustifolia*). **IX Evinci - Evento de Iniciação Científica**. 20 a 21 de outubro de 2010. Colombo, PR, 2010.
16. Cornejo, F.E.P., Nogueira, R.I., Carvalho, C.W.P., Godoy, R.C.G., Agnelli Holanda Oliveira, A.H., Santos, L.F.C., Barreto, A.G., Freitas, S.P. Descascamento e Secagem de Pinhão (*Araucaria angustifolia*) para a Obtenção de Farinha. **Embrapa – comunicado técnico 206**. Dezembro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

17. Costa, M.P., Balthazar, C.F., Moreira, R.V.B.P., Cruz, A.G., Júnior, C.A.C. Leite Fermentado: Potencial Alimento Funcional. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.9, N.16; p. 1387, Goiania, GO, 2013.
18. Costa, F.J.O.G. & Daudt, R.M. Avaliação, caracterização de pinhão (sementes de *Araucaria angustifolia*) nativas do estado do Paraná e seu uso em um produto alimentício. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2014.
19. Costa, O.S. Bases florísticas para construção de trilha interpretativa e programas de educação ambiental na empresa radio hotel (Serra Negra, SP). **Revbea - Revista Brasileira de Educação Ambiental**. V. 12, n1: p. 209-223, São Paulo, SP, 2017.
20. Danner, M.A., Zanette, F., Ribeiro, J.Z. O cultivo da araucária para produção de pinhões como ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.32, n.72, p.441-451. 2012.
21. Daudt, R.M., Guerreiro, I.C.K., Olivera, F.C., Thys, R.C.S., Marczak, L.D.F. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**. V. 52. Pag.420–429, St Martin d'Heres, França, 2014.
22. Daudt, R.M. Aplicação dos componentes do pinhão no desenvolvimento de produtos inovadores nas indústrias cosméticas e de alimentos. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2016.
23. David, A.A.R. & Silochi, R.M.H.Q. Avaliação de métodos para conservação de pinhão. **Revista Faz Ciência**, v.12, n.15 - pp. 207-216. Janeiro/Junho, Francisco Beltão, PR, 2010.
24. Dorneles, R.C. **DERAL- Departamento de Economia Rural**. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Pinhão. Abril, Curitiba, PR, 2015.
25. EMBRAPA. Valor Nutricional do Pinhão. **Embrapa Florestas**. Colombo, PR, 2018.

26. Esquenazi, D. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**. v.153, n. 10, p. 647-652, December, Paris, France, 2002.
27. Ferreira, L.L.D.M., Pereira, R.V., Muzitano, M.F., Guimarães, D.O., Raimundo, J.M., Leal, I.C.R. Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato Hidroalcoólico e partições das folhas *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae). Sociedade Brasileira de Química (SBQ). **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Criar e Empreender**, Goiânia, GO, 2016.
28. Forlin, D., Bezerra, J.R.M.V., Rigo, M., Bastos, R.G., Kopf, C. Viabilidade do Processamento de Pães com Farinha de Pinhão e logurte. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais - Ambiência**, v.5 n.1 p.93 - 100 Janeiro/Abril, Guarapuava, PR, 2009.
29. Garcia, C. Alterações fisiológicas e bioquímicas em Sementes de *Araucaria angustifolia* (bertoloni) Otto kuntze sob condições controladas de armazenamento. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2012.
30. Giazzon, I., Michelon, F., Spada, P.D.S., Salvador, M. Atividade antioxidante de sementes de *Araucaria angustifolia*. **XVII Encontro de Jovens Pesquisadores**. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Universidade de Caxias do Sul. Setembro, Caxias do Sul, RS, 2009.
31. Grynberg, N.F., Carvalho, M.G., Velandia, J.R., Oliveira, M.C., Moreira, I.C., Braz-Filho, R., Echevarria, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.35, n. 7, p. 819-822, Ribeirão Preto, SP, 2002.
32. Guidolin, M.E.B.Z., Demiate, I.M., Godoy, R.C.B., Scheer, A.P., Grewell, D., Jane, J. Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). **Food Hydrocolloids** - V.63. Pag.19 – 26, Wrexham, País de Gales, Reino Unido, 2017.

33. Hatschbach, G.G. & Ziller, S.R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná**. Editora RBC Propaganda, p. 18-19, Curitiba, PR, 1995.
34. IBGE. **Censo Agropecuário**. P.1-777. Rio de Janeiro, RJ, 2006.
35. Klein, M.I., Biondo, E., Kolchinski, E.M., Padilha, R.L., Brandelli, A., Sant'Anna, V. Avaliação da atividade antimicrobiana e alelopática de extrato de casca de pinhão. **5º Simpósio de Segurança Alimentar – Alimentação e Saúde**. 26 a 29 de maio. Bento Gonçalves, RS, 2015.
36. Koehnlein, E.A. Carvajal, A.E.S. Koehnlein, E.M. Moreira, J.S.C., Inácio, F.D., Castoldi, R., Adelar Bracht, A., Peralta, R.M. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**. Vol. 6 (21) pp. 512-518, 15, Maringá, PR, 2012.
37. Leite, D.M.C. Avaliação Nutricional da Semente do Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*). **Dissertação de Mestrado**, programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.
38. Lin, Y., Flavin, M.T., Schure, R., Chen, F., Sidwell, R., Barnard, D.I., Huffmann, J.H., Kern, E.R. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**. v. 65, n. 2, p.120-25, Stuttgart, DE, 1999.
39. Lorenzi, H. **Árvores Brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora Instituto Plantarum, p. 51, Nova Odessa, SP, 2000.
40. Macedo, L.M., Lacerda, A.E.B., Sebbenn, A.M., Ribeiro, J.Z., Soccol, C.R. Bittencourt, J.V.M. Using genetic diversity and mating system parameters estimated from genetic markers to determine strategies for the conservation of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Conservation Genetics**. V. 17: Pag. 413–423, 2016.
41. Marquesini, N.R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá.

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1995.

42. Nascimento, T.C., Ferreira, P.V.S., Bento, C.R., Vale, R.C., Oliveira, S.P., Martins, J.M. Caracterização físico-química e microbiológica de iogurte grego produzido por uma agroindústria do município de guarani, MG. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; XCIGR Section International Technical Symposium. 24 a 27 de outubro, FAURGS – Gramado, RS, 2016.
43. Ohashi, H., Kawai, S., Sakurai, Y., Yasue, M. Norlignan from the knot resin of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 4, p. 1371-1373, Nantes, France, 1992.
44. Oliveira, J.R. Análise dendrocronológica de *Araucaria angustifolia* em Santa Catarina, Brasil. **Dissertação de tese de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Florestal, da Universidade Regional de Blumenau - FURB, Blumenau, SC, 2015.
45. Paraná. Governo do Estado do Paraná. Lei Estadual Nº. 7957 de 12 de novembro de 1984. Gralha Azul. **Governo do Paraná**. Curitiba, PR, 1984.
46. Paraná. Governo do Estado do Paraná. Portaria IAP Nº 46 de 26 de março de 2015. Institui os procedimentos para controle da exploração do Pinhão e define outras providências. **Governo do Paraná**. Curitiba, PR, 2015.
47. Parveen, N., Taufeeq, H.M., Khan, N.U. Biflavones from the leaves of *Araucaria araucana*. **Journal of Natural Products**. v. 50, n. 2, p. 332-333, Washington, DC, 1987.
48. Peralta, R.M., Koehnlein, E.A., Oliveira, R.F., Correa, V.G., Corrêa, R.C.G., Bertonha, L., Bracht, A., Ferreira, I.C.F.R. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**. V. 54. Pag.85 a 93, Norwich, Reino Unido, 2016.
49. Polet, J.P. Elaboração, análise físico-química e sensorial de pães de forma a partir de polpa de Pinhão (*Araucaria angustifolia*). **Dissertação de Graduação**, Programa

de Graduação em Nutrição. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

50. Reinert, B.L. & Bornschein, M.R. Alimentação da gralha-azul (*Cyanocorax caeruleus*, Corvidae). **Ornitologia Neotropical**. V. 9: 213–217, Curitiba, PR, 1998.
51. Rizzini, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil – Manual de Dendrologia Brasileira**. Editora Edgard Blucher Ltda, p.30 – 34, São Paulo, SP, 1986.
52. Saarinen, N.M., Smeds, A., Mäkelä, S.I., Ämmälä, J., Hakala, K., Pihlava, J., Ryhänen, E., Sjöholm, R., Santti, R. Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. **Journal of Chromatography B**. v.777, n. 1-2, p. 311-319, EUA, 2002.
53. Santos, A.J., Corso, N.M., Gílson Martins, G., Bittencourt, E. Aspectos Produtivos e Comerciais do Pinhão no Estado do Paraná. **FLORESTA**, v. 32 (2): p.163-169, Curitiba, PR, 2002.
54. Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.M., Saura-Calixto, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.53, p. 310–329, Weinheim, Germany, 2009.
55. Souza, M.D.O. Caracterização química, atividade antioxidante e antígeno-tóxica de extrato de brácteas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Dissertação de Mestrado**, programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2013.
56. Verdi, M. **Flora Digital do Rio Grande do Sul: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. 2010.

Capítulo I – Artigo: Desenvolvimento e Caracterização de Farinha de Pinhão (*Araucaria angustifolia*)

Resumo – O pinheiro Araucária é uma planta nativa da região sul do Brasil. Seu fruto, o pinhão, é muito apreciado pela população na forma cozida ou assada. O objetivo deste trabalho foi obter farinhas a partir de pinhão cru e cozido, e analisar as propriedades físico-químicas e microbiológicas destas em relação ao pinhão *in natura*. Os pinhões foram separados em três lotes: dois lotes processados como farinha (cozida e crua), e um lote analisado *in natura*. A caracterização química deu-se através das seguintes análises: umidade, sólidos totais, cinzas, lipídeos, proteínas, fibra bruta e carboidratos. Foram determinados índices de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g), contagem de bolores e leveduras (UFC/g), determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e pesquisa de *Salmonella* sp. Os resultados das análises físico-químicas não demonstraram diferença significativa para os teores de carboidratos (76,1–78,5%), resíduo mineral fixo (2,6-2,7%), proteínas (7,1–7,3%), sólidos totais (91,3–92,4%) e umidade (7,5–10,3%). Ocorreram diferenças entre as farinhas e o pinhão *in natura*. As farinhas apresentaram teores baixos de fibras (2,4–2,6%) quando comparado ao pinhão cru. As avaliações microbiológicas não evidenciaram desenvolvimento microbiano para nenhum parâmetro pesquisado. A produção de farinhas de pinhão é uma alternativa viável para melhorar a conservação do produto, aumentando suas possibilidades de utilização devido à melhor estocagem e preservação, com composição adequada para aplicação em vários produtos derivados e ou uso como ingrediente em várias formulações alimentícias.

Palavras chave: Avaliação microbiológica, Brazilian pine, composição centesimal.

1. Introdução

A busca por alternativas para a produção e diferenciação de produtos já existentes abre um grande campo de novas descobertas. O uso de matérias-primas não convencionais como o pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, é algo que vem de encontro a esta necessidade, tendo em vista que este é um alimento com grandes propriedades nutricionais, sem uso industrial, apresentando assim uma nova opção para quem busca uma dieta mais nutritiva e diversificada.

Uma alternativa para aumentar e incentivar o consumo do pinhão, produto rico em nutrientes, seria a fabricação de farinha, podendo esta ser utilizada na

confeção de inúmeros produtos alimentícios. Hoje a produção de farinha é feita apenas de modo artesanal nas regiões aonde ainda restam as Araucárias (Leite, 2007). A obtenção de farinha de pinhão poderia prover um produto com alto teor de fibras, com alto valor nutricional, além de permitir o aproveitamento desta matéria-prima raramente utilizada na indústria (Acorsi et al., 2008).

De acordo com Forlin et al. (2009) com farinha de pinhão é possível confeccionar broas, tortas e pães. O pinhão pode ser consumido diretamente ou misturado a saladas ou molhos para carnes. Também pode ser utilizado para o preparo de suflê, de rocambole, de pudim, entre outros alimentos. Apesar dessas opções e ocorrência abundante no estado do Paraná, são raros os estudos que visam ao aproveitamento dessa matéria-prima incorporada a produtos alimentícios. Além disso, o consumo da farinha de pinhão poderia ser uma alternativa a pessoas portadoras de doença celíaca, por não conter glúten em sua composição. A doença celíaca é a intolerância permanente ao glúten, que danifica as vilosidades do intestino delgado e prejudica a absorção dos alimentos nestes indivíduos (Polet, 2014).

A parte comestível da semente, conhecida como pinhão, é consumida por diferentes espécies de animais, especialmente roedores e pássaros, bem como humanos e possui um alto valor nutricional. Índios do sul do Brasil costumam comer pinhão desde tempos pré históricos. Especialmente durante o inverno, cozido ou sob a forma de farinha, sendo muitas vezes o alimento mais importante para a sobrevivência da comunidade indígena (Peralta et al., (2016).

A farinha de pinhão pode ser considerada como uma nova opção tecnolôgicade utilização de matérias-primas com caracter inovador e como fonte nutricional para possíveis formulações de produtos alimentícios, incluindo pães sem glúten, bem como agente microencapsulador (Santos et al., 2018).

As vantagens da utilização de técnicas de conservação de produtos como, por exemplo, os processos de secagem, estão relacionados com a redução do seu peso e volume, dos custos de transporte e armazenamento, bem como o aumento da vida-de-prateleira dos alimentos (Capella et al., 2009), por isso se justifica a produção da farinha de pinhão, pois se acredita que esta se mantenha estável, sem degradações e alterações, por mais tempo que o produto *in natura*, que possui uma vida útil relativamente curta comparada com outros tipos de amêndoas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de farinhas de pinhão cozido e de pinhão cru e comparar as propriedades bromatológicas e características físico-químicas e microbiológicas que possam existir entre os dois diferentes tipos de farinhas e o

pinhão *in natura*.

2. Metodologia

2.1. Produção da Farinha de Pinhão

Os pinhões foram adquiridos na região rural da cidade de Guarapuava/PR, diretamente dos produtores, sendo conservados em temperatura ambiente (em torno de 18°C) até o processamento. As farinhas foram elaboradas de acordo com procedimento descrito na Figura 7. A metodologia seguida foi a proposta por Waszczynskyj & Costa (2014), com adaptações. Primeiramente, foi realizada a lavagem em água corrente, sendo em seguida escorridos em peneiras plásticas e espalhados para secar naturalmente, após este processo foi feita a seleção da matéria-prima e, em sequência, foram realizados dois procedimentos diferentes:

1º - os pinhões crus foram descascados manualmente e triturados em liquidificador doméstico para obtenção de uma massa de menor diâmetro;

2º - os pinhões foram previamente cozidos em panela de pressão doméstica por cerca de 40 minutos a uma temperatura de 110° C, foram descascados manualmente e triturados em liquidificador doméstico até obtenção de uma massa de menor diâmetro.

As massas obtidas foram distribuídas homogeneamente em bandejas de alumínio e levadas para serem secas em estufa de convecção simples, com calor controlado entre $55 \pm 5^\circ\text{C}$ por um período de 22 ± 2 horas. Foram consideradas como secas quando as massas atingissem umidade entre $6,5 \pm 5,5$ m/m.

A recomendação máxima para farinhas, amido de cereais e farelos deve ser 15,0% (g/100g) de umidade (BRASIL, 2005). Após resfriamento, as massas secas foram novamente trituradas em liquidificador para que ficassem mais finas, homogêneas e caracterizadas como uma farinha.

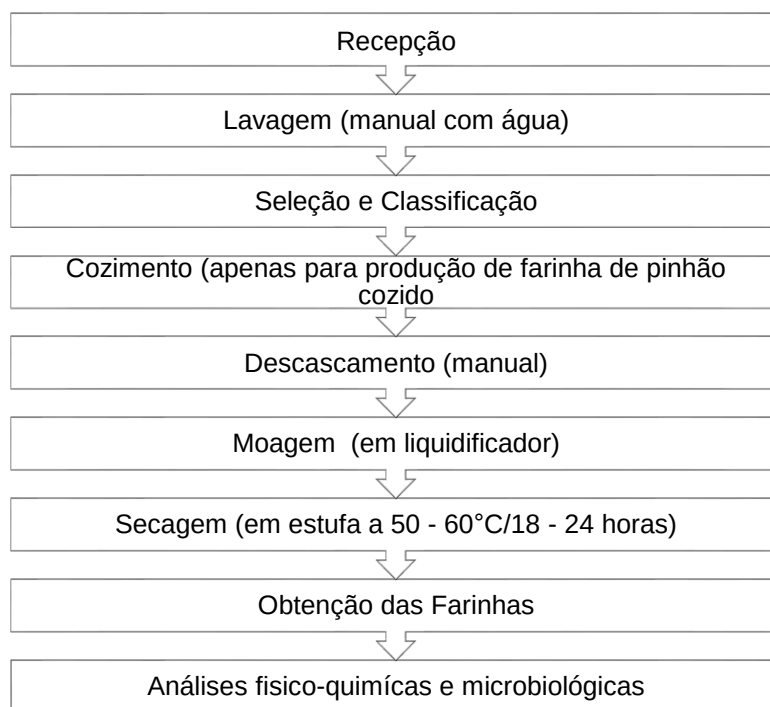


Figura 7: Fluxograma de obtenção das farinhas de pinhão.

Fonte: Autoria própria (2019).

2.2. Caracterização bromatológica e físico-química das farinhas

As análises bromatológicas e físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Cascavel/PR; tendo sido feitas em triplicata, para os teores de umidade usando-se estufa a 105 °C até peso constante; Sólidos totais, estimado por diferença de 100%, resíduo mineral fixo por calcinação a 550 °C; lipídeos por extração em Soxhlet durante 8 h, e posterior evaporação do solvente; proteínas por micro-Kjeldahl, fibra bruta em solução ácida e carboidrato, estimado por diferença, subtraindo de 100% o valor dos demais componentes. Todas as análises foram realizadas segundo Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.3. Análises microbiológicas das farinhas

As amostras foram submetidas às análises microbiológicas de determinação do Número Mais Provável por grama de amostra (NMP/g) para coliformes totais e coliformes termotolerantes realizado por meio de teste presuntivo e confirmativo, para coliformes totais e termotolerantes; pesquisa de *Salmonella spp*, foi realizada por meio de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e por confirmação preliminar das colônias típicas, com resultados sendo expressos como ausência ou presença do micro-organismo em 25g de amostra; contagem de *Staphylococcus*

coagulase positiva (UFC/g) pelo método de plaqueamento em meio de cultivo Agar Baird-Parker e Contagem de bolores e leveduras (UFC/g) pelo método de plaqueamento em superfície utilizando meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Os resultados das análises microbiológicas foram comparados aos padrões estabelecidos pela RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), a qual aprova, no Art. 1º, o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

2.4. Análise estatística dos dados

O experimento foi analisado segundo delineamento inteiramente casualizado, com no mínimo três repetições para as análises físico-químicas, sendo os dados submetidos ao programa Minitab® versão 17 para obtenção das médias e desvio padrão.

Os resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) a 5% de significância. A indicação de diferença significativa entre os grupos foi realizada por teste de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey) a 5% de significância.

3. Resultados e Discussão

As farinhas mostraram características distintas em relação à cor, uma vez que a farinha de pinhão cru se assemelhava à farinha de trigo comum em termos de cor e textura (Figura 8) e a farinha de pinhão cozido mostrou uma cor amarelada e maior densidade (Figura 9), provavelmente devido à incorporação de compostos fenólicos do revestimento e adsorção de água, conforme também observado por Peralta et al. (2016).

A coloração escura apresentada na farinha de pinhão cozido provavelmente pode estar relacionada a um conjunto de reações de oxidação, além da reação de Maillard e migração de substâncias coloridas da casca para o interior do pinhão, como já citado anteriormente.



Figura 8: Imagem A: Farinha de pinhão cru processada. Imagem B: Farinha de pinhão cru antes da 2ª trituração.

Fonte: Autoria própria (2019).



Figura 9: Imagem A: Farinha de pinhão cozido processada. Imagem B: Farinha de pinhão cozido antes da 2ª trituração.

Fonte: Autoria própria (2019).

A Tabela 4 mostra os resultados das análises químicas das amostras de farinhas em comparação com o pinhão *in natura*. A análise do teor de umidade mostrou que as amostras de farinha estavam de acordo com os padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira, que define índice máximo de umidade de 15%, para farinhas, amido de cereais e farelos (BRASIL, 2005), embora não exista especificação para farinhas de pinhão. Entre as farinhas analisadas, verificou-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). A farinha de pinhão cozido apresentou maior teor de umidade ($8,72 \pm 1,21\%$) em relação à farinha de pinhão cru ($7,57 \pm 0,23\%$) (Tabela 4). Este resultado se deve ao fato desta farinha ter apresentado grânulos maiores e também pelo fato da água entrar em contato com o pinhão durante o cozimento. Os valores de umidade das amostras estão próximos aos encontrados por Reineri et al.(2017), que obtiveram para farinha de pinhão

cozido o valor de 10,6% e Pigozzi et al. (2015), que registrou para a farinha de pinhão cru 5,8% umidade.

O teor médio obtido para resíduo mineral fixo nas amostras das farinhas de pinhão cru e cozido foi de $2,60 \pm 0,07\%$ e $2,74 \pm 0,19\%$, respectivamente (Tabela 4). Para o pinhão *in natura*, a média obtida foi de 1,45% (Tabela 4), inferior ao registrado por Batista (2014), que obteve 2,5%.

Para sólidos totais, os resultados médios encontrados foram de $92,43 \pm 0,23\%$ para farinha de pinhão cru e $91,28 \pm 3,49\%$ para farinha de pinhão cozido (Tabela 4), não apresentando uma variação significativa ($p > 0,05$) entre as amostras analisadas. A amostra *in natura* apresentou um teor de sólidos totais inferior aos das farinhas $64,34 \pm 0,50\%$, perdendo mais água em relação às farinhas por não ter sido previamente desidratada em estufa.

As farinhas de pinhão cru e cozido registraram teores de lipídeos de $1,57 \pm 0,26\%$ e $1,29 \pm 0,27\%$, respectivamente (Tabela 4). O valor para a farinha de pinhão cru está muito próximo ao obtido por Pigozzi et al. (2015) e Forlin et al. (2009) que obtiveram 1,7% e 1,8%, respectivamente. Já a farinha de pinhão cozido obteve um resultado bem abaixo se comparado com estudo realizado por Reineri et al. (2017), que obtiveram um percentual de 5,6% e Capella et al. (2009) que obteve 7,2% para este mesmo tipo de produto. Os valores de lipídeos encontrados, embora sejam baixos, podem ser considerados elevados em relação à composição do pinhão cozido 0,7% (TACO, 2011). Estes valores estariam relacionados à concentração dos lipídeos nas amostras de farinha pela perda da água durante o processo de produção e secagem das farinhas.

O teor de proteína encontrado para o pinhão *in natura* ($5,91 \pm 1015\%$) (Tabela 4) foi igual ao valor descrito por Batista (2014) (5,9%). Para a farinha de pinhão cozido o valor encontrado ($7,15 \pm 1029\%$) assemelha-se ao retratado por Forlin et al. (2009) que foi de 7,9% e superior ao descrito por Reineri et al. (2017) que obteve 5,5%. A farinha de pinhão cru apresentou um teor de proteínas de $7,31 \pm 1,18\%$, valor um pouco superior ao encontrado por Pigozzi e colaboradores (2015), que foi de 5,1%. O pinhão é um produto que apresenta abundante quantidade de proteínas (3,0 g / 100 g), e assim como ocorreu com os valores de lipídeos, a secagem promoveu uma concentração deste composto e, conseqüentemente, a obtenção de valores mais elevados. Não houve diferença significativa entre os resultados da análise de proteínas ($p > 0,05$) entre as duas farinhas analisadas e também em comparação com o pinhão cru.

Não há padrão legal para comparação dos teores de fibras em farinhas de pinhão. O valor encontrado para farinha de pinhão cru foi de $2,40 \pm 1,07\%$ e para farinha de pinhão cozido foi de $2,64 \pm 0,49\%$ (Tabela 04), valores semelhantes ao valor de fibras da proteína texturizada de soja (2,7%), descrito por Guilherme & Jokl (2005) e superior ao valor de fibras descrito na legislação para farinhas de mandioca (2,3%) (BRASIL, 2011).

Os valores de carboidratos encontrados para as farinhas de pinhão cru e cozido foram de 78,56% e 75,69% para as amostras analisadas (Tabela 4), valores bastante elevados, mas semelhantes aos parâmetros encontrados por Costa (2014) para amidos de pinhão (88,9%). Os valores altos obtidos para carboidratos podem ser justificados pela grande presença de amido neste tipo de alimento, como descrito por Corrêa & Helm (2010) 25,7% e TACO (2011), de 43,9%.

Os resultados das avaliações microbiológicas das amostras de farinha de pinhão cru e cozido e do pinhão *in natura*, estão dispostos na Tabela 5.

Observa-se baixo índice de contaminação por coliformes totais ($<3,0\text{NMP/g}$), na totalidade das amostras, assim como coliformes termotolerantes ($<3,0\text{NMP/g}$). Os bons resultados encontrados demonstram que o processamento das farinhas ocorreu de maneira adequada e dentro dos padrões de higiene para manipulação de alimentos.

O Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos (RDC nº12/2001) estabelece um parâmetro qualitativo para *Salmonella spp.* (ausência em 25g). Se presente este microrganismo, independentemente da quantidade, a amostra não estará de acordo com a legislação. Nas análises realizadas, não foi detectada presença de *Salmonella spp.* (em 25g), ou seja, as amostras atenderam ao padrão estabelecido pela legislação encontrando-se aptas para o consumo.

Todas as três amostras analisadas apresentaram contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* menor do que 10 UFC/g, portanto abaixo do limite máximo estabelecido pela Resolução RDC nº 12/2001, da ANVISA, que é de $5,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001).

Já para as variáveis de bolores e leveduras, as amostras analisadas apresentaram contaminação (menor do que 10^0 UFC/g) (Tabela 5), valores abaixo do descrito no Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos, já citados anteriormente, que estabelece um máximo de 10^3 UFC/g. Esta contaminação poderia ser atribuída a diversos fatores como eventuais deficiências no processamento, na sua manipulação e ainda durante a estocagem.

Tabela 4: Resultados médios (%m/m) e erro padrão da composição química do pinhão *in natura* e das farinhas de pinhão cru e cozido.

Amostras	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Sólidos Totais	Umidade	Carboidratos	Fibra Bruta
FPC	2,60 ± 0,07 A	1,57 ± 0,26 A	7,31 ± 1,18 A	92,43 ± 0,23 A	7,57 ± 0,23 A	78,56 A	2,40 ± 1,07 A
FPCZ	2,74 ± 0,19 A	1,29 ± 0,27 AB	7,15 ± 1,29 A	91,28 ± 3,49 A	8,72 ± 1,21 B	75,69 A	2,64 ± 0,49 A
PC	1,45 ± 0,24 A	1,06 ± 0,24 B	5,91 ± 1,15 A	64,34 ± 0,50 B	35,66 ± 0,50 C	52,51 B	3,08 ± 1,56 A

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente, considerando amostras analisadas em triplicata. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC).

Tabela 5: Resultados das avaliações microbiológicas das amostras de farinha de pinhão cru e cozido e do pinhão *in natura*.

Amostra	Coliformes Totais e Termotolerantes	Salmonella spp.	Staphylococcus coagulase positiva	Bolores e Leveduras
FPC	< 3,0 x 10° UFC/mL	Ausência	< 10UFC/mL	< 10 UFC/mL
FPCZ	< 3,0 x 10° UFC/mL	Ausência	< 10UFC/mL	< 10 UFC/mL
PC	< 3,0 x 10° UFC/mL	Ausência	< 10UFC/mL	< 10 UFC/mL

Fonte: Autoria própria (2019).

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC).

Cabe ressaltar que, mesmo adequadamente embalados e protegidos da umidade, estes micro-organismos são resistentes e podem viver por muito tempo em baixas concentrações de água.

4. Conclusão

Os resultados das análises químicas das farinhas de pinhão cru e cozido não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros de lipídeos, cinzas e proteínas. No entanto, entre as farinhas e o pinhão *in natura*, ocorreram diferenças resultantes do processamento, especialmente no parâmetro da umidade. Todos os parâmetros microbiológicos apresentaram resultados dentro do padrão indicado em legislação para farinhas, demonstrando que o processo de fabricação foi correto e que as farinhas estavam aptas ao consumo.

Considerando que a umidade irá influenciar a estabilidade do produto, favorecendo a aceleração da sua degradação, quanto mais elevada estiver a umidade, maior o risco de contaminação. Os resultados de umidade encontrados para as duas farinhas obtidas estavam de acordo com o especificado em legislação para outros tipos de farinhas, demonstrando que o processamento do pinhão e obtenção das farinhas foi satisfatório, constituindo uma interessante alternativa tecnológica para este alimento, aumentando a sua comercialização e utilização por um período prolongado, além de sua utilização como ingrediente na produção de outros alimentos, bem como de produtos inovadores e diferenciados.

5. Referências bibliográficas

1. Acorsi, D.M., Bezerra, J.R.M.V., Barão, M.Z., Rigo, M. Viabilidade do processamento de biscoitos com farinha de pinhão. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**. V. 5 N. 2 Maio/Agosto, Guarapuava, PR, 2009.
2. Batista, R. A. Produção e avaliação sensorial de cerveja com Pinhão (*Araucaria angustifolia*). **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2014.
3. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC Nº 12, de 02 De Janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 de janeiro de 2001.
4. BRASIL. Resolução RDC nº 263, de 23 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.
5. BRASIL. Instrução Normativa Nº 52 de 08 de novembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estabelece o Regulamento Técnico da Farinha de Mandioca. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2011.
6. Capella, A.C.V., Penteado, P.T.P.S., Baldi, M.E. Semente de *Araucaria angustifolia*: Aspectos Morfológicos e Composição Química da Farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos – CEPPA**. v. 27, n. 1, p. 135-142, janeiro/junho, Curitiba, PR, 2009.
7. Corrêa, M.F. & Helm, C.V. Caracterização da composição nutricional do pinhão in natura e cozido (*Araucaria angustifolia*). **IX Evinci - Evento de Iniciação Científica**. 20 a 21 de outubro de 2010. Colombo, PR, 2010.
8. Costa, F.J.O.G. & Daudt, R.M. Avaliação, caracterização de pinhão (sementes de *Araucaria angustifolia*) nativas do estado do Paraná e seu uso em um produto

alimentício. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2014.

9.Forlin, D., Bezerra, J.R.M.V., Rigo, M., Bastos, R.G., Kopf, C. Viabilidade do Processamento de Pães com Farinha de Pinhão e Iogurte. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais - Ambiência**, v.5 n.1 p.93 - 100 Janeiro/Abril, Guarapuava, PR, 2009.

10.Guilherme, F.F.P. & Jokl, L. Emprego de fubá de melhor qualidade protéica em farinhas mistas para produção de biscoito. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. vol.25 nº 1. Janeiro/Março, Campinas, SP, 2005.

11.INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. V. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. IMESP, 1985. São Paulo, SP, 2008.

12.Leite, D.M.C. Avaliação Nutricional da Semente do Pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*). **Dissertação de Mestrado**, programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

13.Peralta, R.M., Koehnlein, E.A., Oliveira, R.F., Correa, V.G., Corrêa, R.C.G., Bertonha, L., Bracht, A., Ferreira, I.C.F.R. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**. V. 54. Pag.85 a 93, Norwich, Reino Unido, 2016.

14.Pigozzi, L., Conto, L.C., Veeck, A.P.L. Análise da composição centesimal, da presença de compostos fenólicos e da atividade antioxidante em pinhão, sob diferentes formas de processamento. **Instituto Federal de Santa Catarina**, Lages, SC, 2015.

15.Polet, J.P. Elaboração, análise físico-química e sensorial de pães de forma a partir de polpa de Pinhão (*Araucaria angustifolia*). **Dissertação de Graduação**, Programa de Graduação em Nutrição. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

16.Reineri, D., Sinsen A.C., Bernardi, N.C. Obtenção e caracterização da farinha de amêndoa da semente de *Araucaria angustifolia*. **Synergismus scyentifica UTFPR**. V.12. Pag. 81-87, Pato Branco, PR, 2017.

17.Santos, C.H.K., Baqueta, M.R., Coqueiro, A., Dias, M.I., Barros, L., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., Gonçalves, O.H., Bona, E., Silva, M.V., Leimann, F.V. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*Araucária angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**. V. 261. Pag. 216-223, Norwich, Inglaterra, Reino Unido, 2018.

18.TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ª edição revisada e ampliada. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP, 2011.

19. Waszczyzyskyi, N. & Costa, F.J.O.G. Processo de obtenção de farinha de pinhão (*Araucaria angustifolia*). Depositante: Universidade Federal do Paraná. BR1020120152444A2. Depósito: 20 jun. 2012. Concessão: 05 ago. 2014.

Capítulo 2. Artigo: Desenvolvimento de iogurte adicionado de Pinhão (*Araucaria angustifolia*)

Resumo - Leites fermentados são produtos com elevado potencial para o desenvolvimento de novos produtos, principalmente por estarem associados à saúde, o que vem sendo explorado pelas indústrias de laticínios. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um iogurte acrescido de pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, e de suas farinhas e avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas deste novo produto, além de sua aceitação pelo público consumidor. A caracterização físico-química e propriedade reológica deram-se através das seguintes análises: pH, umidade, sólidos totais, resíduo mineral fixo, lipídeos, proteínas, carboidratos totais, acidez titulável, sinérese. Foi realizada uma contagem total de bactérias lácticas. Foi determinado índices de Coliformes totais e termotolerantes (NMP/g), pesquisa de *Salmonella spp.*, determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g). Também se realizou avaliação da capacidade antioxidante dos iogurtes. Os resultados das análises físico-químicas não apresentaram divergências quanto aos teores de umidade, cinza e sinérese. O teor pH encontrava-se fora dos padrões nas amostras com farinha de pinhão cru e pinhão cru no 14º dia de análise (pH > 4,0), retornando ao normal após 21 dias. O valor de acidez em 50% das amostras encontrava-se fora dos padrões (0,6 – 1,5%) para este tipo de produto no primeiro dia de produção, ficando adequados após 8 dias do produto pronto. Os parâmetros de proteínas estavam em 75% das amostras fora do estabelecido em legislação (2,9%). A contagem de bactérias lácticas demonstrou que 100% das amostras avaliadas apresentavam valores superiores ao descrito em legislação (> 10⁷ UFC/g). As avaliações microbiológicas não evidenciaram desenvolvimento microbiano para os parâmetros de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* Na contagem de Coliformes totais, 60% das amostras estavam fora dos parâmetros recomendados, devido provavelmente a práticas inadequadas durante a produção. A avaliação da atividade antioxidante demonstrou que os iogurtes acrescidos de pinhão ou de suas farinhas não apresentam boa atividade quando avaliados pelo método DPPH. Na avaliação sensorial ficou demonstrado que os leites produzidos com pinhão cru e sua farinha apresentaram melhor aceitação pelo público, não apresentando diferença significativa na avaliação estatística. Levando-se em conta todos os parâmetros positivos em relação a este produto, pode-se acreditar que este leite fermentado é um potencial candidato a ser

produzido de forma industrial e chegar ao mercado consumidor como um produto inovador.

Palavras chave: Atividade antioxidante, avaliação sensorial, desenvolvimento novos produtos.

1. Introdução

O leite fermentado é considerado um alimento funcional e já faz parte da alimentação de muitas pessoas, devido à sua praticidade de produção e consumo. Confere benefícios quando administrado nas doses recomendadas (Oliveira et al., 2018).

O leite fermentado foi produzido pela primeira vez acidentalmente por nômades que estocavam o leite proveniente da ordenha em recipientes ou sacolas feitas de estômago de bode. Esta estocagem era favorecida pelo clima árido e seco da região da Eurásia, o que proporcionou a proliferação de bactérias, as quais modificaram a estrutura daquele alimento, tornando-o sensorialmente atrativo para aqueles indivíduos, além de ser uma forma de conservação do leite (Haenlein, 2007; Oliveira et al., 2018).

Os produtos lácteos representam o mais importante segmento dos alimentos funcionais, sendo os primeiros nesta categoria de alimentos. Os leites fermentados, assim como os iogurtes, são os produtos de escolha pela indústria alimentícia como veículo de culturas probióticas e adição de ingredientes prebióticos, sendo considerados comercialmente os principais alimentos que contém estes compostos (Sanchez et al, 2009).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), entende-se por A legislação é bastante clara, considerando iogurte o leite fermentado derivado exclusivamente da fermentação das bactérias lácteas *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, podendo de formar complementar adicionar alguma outra bactéria como probióticos.

Para alcançar os benefícios pelo iogurte, sendo essa bebida probiótica, o conteúdo de cada bebida lática deve apresentar uma contagem mínima de 10^6 unidades formadoras de colônia por mL durante toda a vida de prateleira do produto, e a temperatura de comercialização não pode ser superior a 10°C. Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas,

conferem algum benefício para a saúde (Hill et al., 2014). Atualmente, os iogurtes são considerados um produto com elevado potencial para o desenvolvimento de novos produtos, principalmente por estarem associados à saúde, o que vem sendo explorado pelas indústrias de laticínios. Este fator está relacionado com três características: (1) as propriedades tecnológicas da matriz láctea, como permitir a viabilidade funcional de ingredientes adicionados ao produto; (2) a elevada praticidade dos derivados lácteos; (3) e a relação que os consumidores fazem dos produtos lácteos com o aspecto de saudabilidade (Costa et al., 2013).

Segundo Santos et al. (2006), alguns dados científicos apontaram uma ingestão insuficiente de vários nutrientes por parte da população mundial como um todo. Como uma das principais características da sociedade moderna, o tempo escasso e o ritmo de vida acelerado nos forçam a realizar as refeições em um tempo cada vez mais célere. A indústria alimentícia, assim como a ciência tecnológica, tem produzido alimentos capazes de nutrir, resultando na promoção do bem-estar, da saúde e reduzindo riscos de doenças. Nesse cenário, o uso de alimentos com propriedades funcionais tem aumentado (Maia & Santos, 2006). Assim a produção de alimentos processados e que contenham nutrientes de origem natural estão cada vez mais em uso. Neste contexto a produção de alimentos com adição de pinhões (fruto da *Araucaria angustifolia*) que se constituem um alimento muito nutritivo e energético para alimentação humana se justifica. (Carvalho, 1994).

De acordo com Lima (2006), o uso da farinha de pinhão, composta basicamente de amido, foi testado no preparo de broas, pirões, tortas, pães, bolos, sopas e croquetes, por substituição integral ou parcial da farinha de trigo. O pinhão se apresenta como um ingrediente versátil na produção de alimentos, uma vez que apresenta características de composição, consistência e sabor que se encaixam nos mais variados tipos de formulações, sendo consumido em diversos pratos na culinária popular.

Segundo estudo realizado por Cordenunsi et. al. (2004), a semente de pinhão é fonte de amido, fibras solúveis e apresenta baixo índice glicêmico, o que justifica seu uso como ingrediente na produção de um iogurte acrescido desta matéria-prima que agregaria valor nutricional ao produto final, além de incentivar o plantio e conservação da Araucária, planta ameaçada de extinção.

O pinhão apresenta grande potencial nutritivo para consumo, mas possui pouca utilização até pelo fato de ser um produto sazonal, no entanto, apresenta grande potencial de uso em diferentes produtos alimentícios. Ou seja, ao se acrescentar o pinhão a uma bebida láctea, tem-se a formulação de um produto

diferenciado, que pode apresentar significativo destaque para o mercado consumidor.

Já existem no mercado diversos produtos designados como leites fermentados, todos apresentando praticamente a mesma formulação, variando apenas a questão dos microrganismos adicionados e dos sabores empregados para obtenção do produto final. Levando em consideração a possibilidade de diversificação, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de uma bebida láctea acidófila acrescida de pinhão com objetivo de aumentar o valor nutricional e agregar uso e valor a esta matéria, nativa da região sul do país e pouco utilizada na indústria alimentícia. Além disso, incentivar o uso deste alimento para produção de diversos produtos com o uso desta matéria-prima em sua composição. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um iogurte acidófilo acrescido de pinhão e de suas farinhas, com atividade probiótica apresentando característica inovadora pela presença desta matéria-prima. Determinação das características físico-químicas, bromatológicas, microbiológicas e sensoriais desta nova formulação de iogurte desenvolvido, verificando se as mesmas se encontram dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), para este tipo de produto. Avaliação da capacidade antioxidante do iogurte, verificando se o mesmo apresenta concentrações que possam classificar este novo produto dentro desta categoria de alimentos.

2. Metodologia

2.1. Desenvolvimento de iogurte acrescido de pinhão

Os pinhões, sementes da *Araucaria angustifolia*, foram adquiridos diretamente de produtores na região rural da cidade de Guarapuava-PR, sendo conservados em temperatura ambiente (média de 18°C), até o processamento dos novos produtos.

Para elaboração dos iogurtes foi realizado um pré-teste para determinar qual a melhor concentração de farinha de pinhão deveria ser utilizada, conforme descrito na Tabela 6. Todas as diferentes formulações foram misturadas em liquidificador doméstico, após a adição das farinhas de pinhão cru e cozido para que a mistura ficasse o mais homogênea possível (Figura 10). As farinhas de pinhão foram produzidas de acordo com o descrito no capítulo 1, sendo utilizados pinhões que passaram por processo de cozimento e pinhões que não passaram por este

procedimento. Os pinhões foram descascados manualmente e triturados em liquidificador doméstico, para obtenção de uma massa de menor diâmetro, sendo esta massa triturada distribuída em formas de alumínio e levadas para estufa de convecção simples, com temperatura controlada com média de $50^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para secagem até atingirem um valor de umidade de, no máximo 15%, sendo então novamente trituradas em liquidificador para obtenção de uma massa de menor diâmetro mais característico como uma farinha.

Tabela 6: Valores do pré-teste para leite fermentado acrescido de pinhão.

Quantidade Leite	Farinha pinhão cru		Farinha pinhão cozido		Valor em gramas
	Amostra	%	Amostra	%	
220 ml	A	5 %	I	5%	11 g
220 ml	B	10%	J	10%	22 g
220 ml	C	15%	K	15%	33 g
220 ml	D	20%	L	20%	44 g
220 ml	E	30%	M	30%	66 g
220 ml	F	40%	N	40%	88 g
220 ml	G	50%	O	50%	110 g
220 ml	H	60%	P	60%	132 g

Fonte: Autoria própria (2019).

Como resultado obteve-se que as concentrações abaixo de 20% não apresentavam sabor acentuado das farinhas de pinhão, não caracterizando o sabor desejado que se esperava em um produto que utilizaria esta matéria-prima como ingrediente diferenciado de sabor.

Verificou-se também que as formulações com concentrações de farinhas acima de 20% não eram viáveis para produção de uma bebida láctea, pois se apresentavam muito espessas, com formação de gel e consistência dura, além de apresentarem grande processo de gelatinização do amido no processo de aquecimento para produção do iogurte. Tornando esta concentração a de escolha para o desenvolvimento do iogurte, pois apresentava sabor mais evidente do pinhão e ainda assim mantinha uma consistência mais líquida e cremosa característica deste tipo de produto.



Figura 10: Bebidas lácteas acidófilas produzidas para o pré-teste de avaliação do percentual a ser adicionado de farinha de pinhão no processamento.

Fonte: Autoria própria (2019).

Em seguida foram preparadas 8 diferentes formulações para verificar qual destas apresentava melhor característica de um iogurte, mediante avaliação sensorial conforme descrito na Figura 13. Primeiro foi preparada uma solução de leite em pó, conforme instruções do fabricante, 125 g de leite em pó para 900 ml de água, a solução obtida foi autoclavada a 121°C por cinco minutos e resfriada até 50°C. Em seguida foram adicionados a solução o açúcar e as farinhas de pinhão cru e cozido ou as proporções de pinhão cru ou cozido da seguinte forma:

- 1º formulação, 20% de farinha de pinhão cozido mais 10% de açúcar;
- 2º formulação, 20% de farinha de pinhão cru mais 10% de açúcar;
- 3º formulação, 20% de pinhão cozido mais 10% de açúcar;
- 4º formulação, 20% de pinhão cru mais 10% de açúcar;

A mistura foi deixada em repouso por dez minutos, para que ocorresse a hidratação das farinhas ou do pinhão pelo leite. Após, a suspensão foi batida em liquidificador doméstico. Por último foi adicionado o inóculo para iogurte e o inóculo de *Lactobacillus acidophilus*, ambos gentilmente cedidos pela empresa Sacco® de acordo com a indicação do fabricante. Misturou-se levemente e levou-se a solução a banho-maria, até que atingisse um pH de 4,6 sendo então acondicionadas em refrigerador.

As outras 4 formulações (5º, 6º, 7º e 8º), foram desenvolvidas com as mesmas porcentagens de farinhas ou pinhão e açúcar o que diferenciou foi a utilização de extrato lisado de células probióticas de *Lactobacillus acidophilus*. O preparo do extrato lisado de células e célula intacta seguiu a metodologia realizada

conforme Lai, Tsai e Lee (2014), com algumas modificações. O *Lactobacillus acidophilus* foi inoculado em caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 horas em jarra de anaerobiose. O procedimento foi repetido duas vezes, utilizando 1 mL do inóculo anterior para completa ativação da cultura. Após crescimento bacteriano, as células foram centrifugadas durante 15 minutos a 4 °C e 12.000 rpm. O precipitado foi lavado duas vezes com solução salina tamponada fosfatada pH 7,2 e, em seguida, ressuspenso em água deionizada para preparo do extrato lisado de células em solução salina para preparo da célula intacta. O número total de células foi ajustado para 9 log UFC.mL⁻¹.

Para romper as células foi utilizado um sonicador ultrassom, em 3 ciclos de 5 minutos, com intervalos de um (1) minuto em banho com gelo. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação (12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C), em centrífuga, cujo sobrenadante foi o extrato lisado de células. A partir do sobrenadante obtido, todo procedimento descrito foi repetido três vezes para garantir o rompimento da célula.

Ao final do processo, o extrato lisado de células foi plaqueado por profundidade conforme descrito por Zayed & Winter (1995), a fim de comprovar o rompimento da célula bacteriana. Para contagem, foram utilizadas placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias, multiplicando-se o resultado individual pelo inverso da respectiva diluição.

O procedimento foi realizado em duplicata com uma repetição e os resultados médios por diluição foram expressos em log UFC mL⁻¹.

Depois de 12 horas em refrigeração todas as 8 diferentes formulações foram consideradas como primeiro dia para realização das análises. Neste mesmo dia foi realizada a análise sensorial.

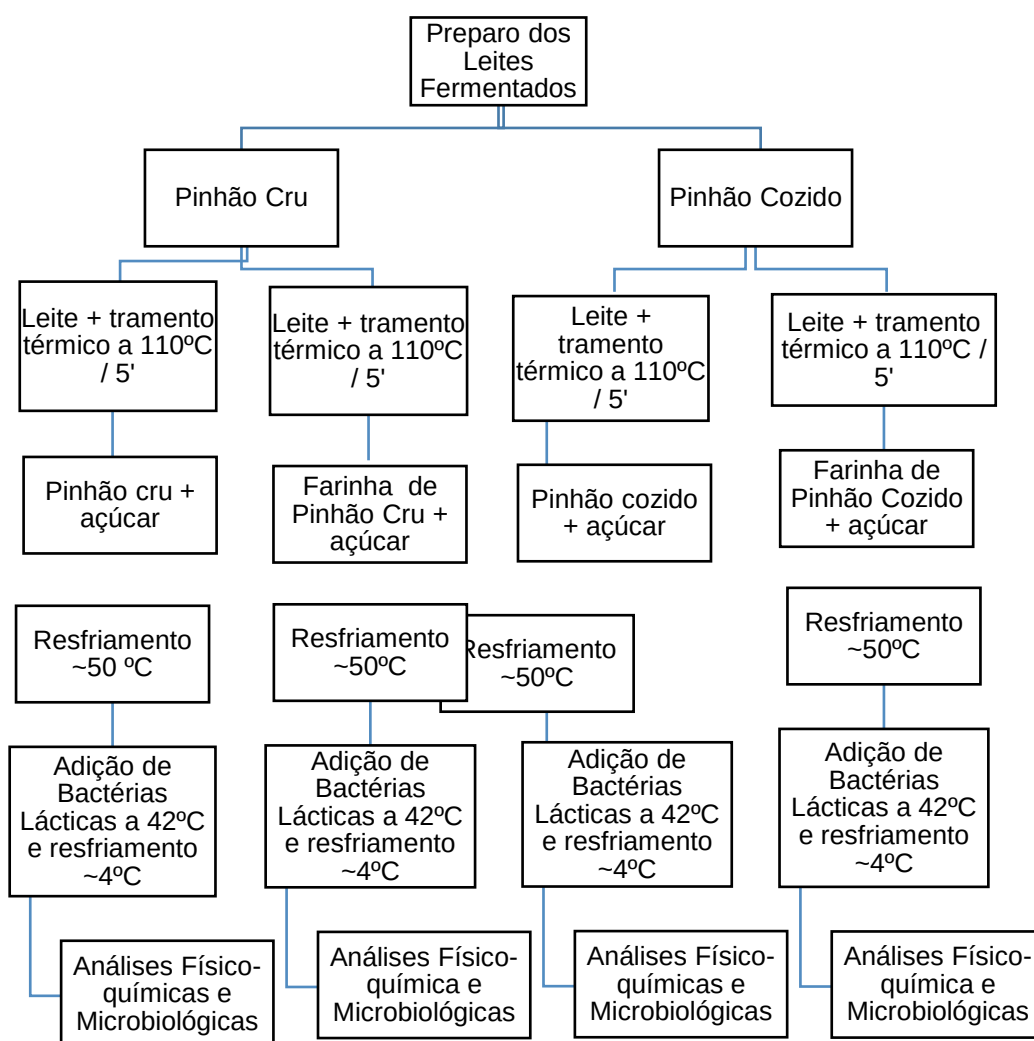


Figura 11: Fluxograma de preparo dos iogurtes acrescidos de pinhão cru ou cozidos e de suas respectivas farinhas.

Fonte: Autoria própria (2019).

2.2. Caracterização físico-química dos iogurtes acrescidos de pinhão

Os parâmetros físico-químicos dos produtos foram acompanhados nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias. As análises realizadas foram: pH, acidez, viscosidade e avaliação de sinérese. Foram realizadas análises dos parâmetros composicionais para umidade, resíduo mineral fixo e proteínas totais.

O processamento dos iogurtes foi realizado nas dependências do Laboratório de Tecnologia em Alimentos, pertencentes à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Cascavel/PR. Tendo sido feitas em triplicata, conforme o que se segue:

As análises bromatológicas e físico-químicas foram preparadas e realizadas no Laboratório de Alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Cascavel/PR; tendo sido feitas em triplicata, a determinação do pH foi realizada por leitura direta utilizando-se potenciômetro de bancada, os teores de

umidade usando-se estufa a 105 °C por 3 horas, até peso constante; Sólidos totais, estimado por diferença de 100%, o valor da umidade da amostra, resíduo mineral fixo por calcinação a 550 °C; lipídeos por extração em Soxhlet durante 8 h, e posterior evaporação do solvente; proteínas por micro-Kjeldahl, carboidrato, estimado por diferença, subtraindo de 100 o valor dos demais componentes. Todas as análises foram realizadas segundo Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). As propriedades reológicas foram realizadas em viscosímetro de bancada após 24 horas de fabricação das novas formulações. A acidez titulável pelo método de Dornic. Todas as análises foram realizadas segundo normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação da Sinérese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Antunes & Fariña (2013), onde cada amostra foi mantida sob refrigeração a 7°C por 28 dias sendo realizado o acompanhamento a cada 7 dias.

2.3. Análises microbiológicas dos iogurtes acrescidos de pinhão

Foram realizadas análises microbiológicas conforme os padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para a contagem total de bactérias lácticas foi usada a metodologia adaptada de Fortuna (2008), incubando as placas a 37°C/48h. Para garantir as condições microaerófilas, além da sobrecamada com MRS, foi utilizado jarros com atmosfera microaerófilas. Para as amostras preparadas com células lisadas esta análise não foi realizada, pois não apresentaria resultados relacionados ao *Lactobacillus acidophilus*, micro-organismo relacionado a esta análise.

As amostras foram submetidas às análises microbiológicas de determinação do Número Mais Provável por grama de amostra (NMP/g) para coliformes totais e coliformes termotolerantes, pesquisa de *Salmonella spp.*, com presença ou ausência, em 25 g de amostra, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g). Os resultados das análises microbiológicas foram comparados aos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Todas as análises microbiológicas foram realizadas com 15 dias de produção dos leites fermentados acidófilos.

2.4. Capacidade Antioxidante dos iogurtes

A avaliação da atividade antioxidante foi feita através da capacidade de varredura do radical livre DPPH, conforme metodologia descrita em literatura, com alterações e adaptação para o produto, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 517 nm, tendo como controle positivo uma mistura de DPPH e solução metanólica.

Primeiramente, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz.

As amostras foram solubilizadas em água destilada na proporção de 1:6 antes de realizar as 3 diluições para a realização das análises. As amostras avaliadas estavam com 19 dias de fabricação quando foi realizada a análise da atividade antioxidante.

Foram feitas diluições de 50, 75 e 100 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 517 nm de todas as soluções, medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como “branco” o metanol. As medidas de absorbância foram efetuadas em duplicata e em intervalos de 1 minuto entre cada leitura.

Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 minutos, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação 1:

$$\text{Equação 1: } \%AA = \frac{\{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

Onde:

- Abs_{controle} é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH;
- Abs_{amostra} é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra);

2.5. Aceitabilidade sensorial

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), sob número de registro CNAE – 02311712.7.0000.0107.

Foi recrutado, um painel de consumidores não treinados, num total de 50 participantes, de ambos os sexos com idades entre 18 e 80 anos, sendo 19 homens e 31 mulheres entre alunos, professores e demais funcionários da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, além de outras pessoas da comunidade. As oito formulações de leite fermentado acrescido de pinhão foram apresentadas aos consumidores de forma aleatória. Os leites fermentados foram servidos em copos descartáveis, codificados com três dígitos sorteados de forma aleatória, contendo aproximadamente 30 mL do produto. Utilizou-se a escala hedônica de nove pontos, variando de “gostei muitíssimo” (escore 9) a “desgostei muitíssimo” (escore 1), para os consumidores expressarem a aceitação em relação à impressão global dos produtos segundo realizado por Conto & Ide (2015), seguindo o proposto por Stone & Sidel (1985).

Os provadores receberam uma amostra de cada produto enumerada e foram orientados a realizarem a degustação da seguinte forma: 1º eles deveriam provar uma das amostras de forma aleatória e atribuir uma nota para este produto; 2º após provar a primeira amostra deveriam tomar um pouquinho de água e aguardar alguns minutos antes de provarem o próximo produto, e proceder desta mesma maneira até que tivessem degustado todas as diferentes formulações, de acordo com a Figura 22 (Anexo 1).

2.6. Análise estatística dos dados

O experimento foi analisado segundo delineamento inteiramente casualizado, com no mínimo três repetições para as análises físico-químicas, sendo os dados submetidos ao programa Minitab® versão 17 para obtenção das médias e desvio padrão.

Os resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) a 5% de significância. A indicação de diferença significativa entre os grupos foi realizada por teste de Comparações de Múltiplas (Teste de Tukey) a 5% de significância.

3. Resultados e discussão

Na Figura 12 é possível observar a consistência dos produtos finais obtidos durante o experimento. Na imagem A destacamos o iogurte fermentado acidófilo produzido com farinha de pinhão cozido e células intactas, no qual é possível

verificar uma consistência mais firme e a presença de grânulos provenientes da farinha, na imagem B vemos o iogurte fermentado acidófilo produzido com a farinha de pinhão cru e células intactas, que se apresenta com uma consistência e coloração mais uniformes bem características de produtos lácteos.



Figura 12: Imagem A: iogurte produzido com farinha de pinhão cozido e células intactas. Imagem B: iogurte produzido com a farinha de pinhão cru e células intactas.

Fonte: Autoria própria (2019).

Na Figura 13 estão apresentadas duas outras diferentes formulações desenvolvidas durante a pesquisa. Na imagem A podemos observar o iogurte fermentado produzido com pinhão cozido e células lisadas, que assim como ocorreu com o produzido com células intactas e farinha de pinhão cozido, também se apresentou com consistência granulosa e mais consistente. Já na imagem B é possível observar que o iogurte fermentado produzido com pinhão cru e células intactas apresentou uma consistência mais líquida e uniforme, bem característica deste tipo de produto.



Figura 13: Imagem A: iogurte com pinhão cozido e células lisadas. Imagem B: iogurte produzido com pinhão cru e células lisadas.

Fonte: Autoria própria (2019).

Importante salientar que tanto o iogurte com pinhão cru ou pinhão cozido ou suas respectivas farinhas com 21 dias já não estavam viáveis para consumo, pois apresentavam odor desagradável, não compatível com o produto. Vale ressaltar que não foi utilizado nenhum tipo de conservante nas formulações desenvolvidas. Utilizamos um prazo máximo de 28 dias para avaliação da qualidade dos iogurtes produzidos, uma vez que em estudos já realizados foi possível verificar que iogurtes vendidos no mercado apresentam variação entre os dias indicados como prazo de validade entre 31 e 70 dias (UFRJ, 2011).

Conforme se observa na Tabela 7, o pH nas amostras de iogurte variou de $3,70 \pm 0,00$ a $5,26 \pm 0,05$, estes valores são superiores aos valores de pH encontrados por Silva et al. (2012), que foi de 3,57 a 4,03. O pH é importante, uma vez que o iogurte com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$) favorece a separação do soro, porque o gel não foi suficientemente formado, por outro lado, em $\text{pH} < 4,0$ ocorre a contração do coágulo devido à redução da hidratação das proteínas, ocasionando também o dessoramento do produto (Silva et al. 2012). O pH é uma avaliação de controle de processo na produção de leites fermentados.

Os valores de pH implicam ainda na atividade metabólica das bactérias, o que pode favorecer um grupo de micro-organismos em detrimento do outro. No caso da fermentação do leite bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococos* (Moreira et al., 1999).

Os valores médios de pH verificados nas amostras de iogurte apresentaram diferenças significativas, no entanto, os valores de desvio padrão são pouco variáveis no decorrer dos dias no mesmo produto e também pouco variável entre as

diferentes formulações avaliadas. Algumas amostras encontravam-se fora do valor preconizado para iogurtes, pH entre 3,5 e 4,6 após 48 horas de fabricação de acordo com a Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007).

Em relação à acidez dos produtos analisados (Tabela 8), o valor mínimo verificado foi de $0,31 \pm 0,03\%$ de ácido láctico no iogurte de farinha de pinhão cozido, já o iogurte com farinha de pinhão cru registrou o valor máximo de acidez entre as amostras analisadas ($1,06 \pm 0,01\%$ de ácido láctico). Devido a esta grande variação, os valores de acidez verificados em 50% das amostras ficaram fora do estabelecido pela legislação brasileira em vigor, que é de 0,6 a 1,5% (BRASIL, 2001), no primeiro dia de fabricação, para as amostras preparadas com células intactas de *Lactobacillus acidophilus*. Já a partir do 7º dia todas as 8 formulações encontravam-se dentro dos padrões estabelecidos na legislação. Acredita-se que o valor alterado de acidez está relacionado a não fermentação pelas bactérias da matéria-prima pinhão utilizada no processo de fabricação. A proteólise do processo começou a ocorrer durante a fermentação e se estendeu ao longo da vida de prateleira. No decorrer dos dias, mais precisamente no 14º, o pH baixou e com isso o valor de acidez aumentou e se enquadrou no valor especificado em Legislação para este tipo de produto.

Em relação à umidade os valores encontrados para os iogurtes com adição de pinhão e ou farinhas de pinhão variaram entre $15,23 \pm 0,20\%$ e $41,80 \pm 1,70\%$ (Tabela 10). Valores bem mais baixos que os descritos por Benica et al. (2014) e Vieira et al. (2017) que foram 74,88% e 72,88%, respectivamente. Vale ressaltar que estes dois autores desenvolveram iogurtes acrescidos de frutas o que justifica o elevado valor de umidade dos produtos finais. Outro fator que pode ter contribuído para que o valor de umidade ficasse mais baixo nos produtos desenvolvidos foi a presença de carboidratos, uma vez que o pinhão é rico em carboidratos 43,9% (TACO, 2011), principalmente amido, o que faz com que o teor de umidade diminua devido à formação de gel.

O teor de resíduo mineral fixo não é contemplado pela Legislação Brasileira vigente, todavia é profundamente influenciado pela matéria-prima. Como neste estudo não houve diferenças entre as concentrações de matéria-prima utilizadas, não deveria ser possível notar grandes impactos no conteúdo mineral, no entanto houve variação significativa no conteúdo mineral dos iogurtes, com amostras apresentando valores entre $3,06 \pm 0,11\%$ e $10,20 \pm 0,40\%$ (Tabela 9). Esta variação pode ser explicada ao fato destas formulações terem sido desenvolvidas com adição de farinha de pinhão cozido e pinhão cozido, amostras que apresentaram maior

concentração de umidade em relação às demais formulações. Este valor elevado de umidade pode ser justificado pelo fato de os pinhões entrarem em contato com a água durante o processo de cozimento, o que teoricamente aumentaria seu valor, contudo vale ressaltar que as outras formulações de iogurte que também utilizaram estes mesmos componentes não apresentaram resultado de resíduo mineral fixo e umidade tão diferente em relação às demais bebidas fermentadas desenvolvidos.

Os valores de proteína (Tabela 9) encontrados nos produtos elaborados ficaram em 75% das amostras acima do mínimo determinado pela legislação que é 2,9% (BRASIL, 2007), valores semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2017) que foi de 3,38%. Na formulação de iogurte com célula lisada e farinha de pinhão cru o valor encontrado de proteína foi de $1,55 \pm 0,82\%$, valor bem abaixo do mínimo preconizado na legislação. Já os valores obtidos para iogurte com célula intacta e pinhão cru e iogurte com célula lisada e pinhão cozido apresentaram valores de proteína mais elevados em relação aos demais, $5,00 \pm 0,00\%$ e $4,00 \pm 0,30\%$, respectivamente.

Para Singh & Heldman (1993), a viscosidade é a propriedade do fluido que tem maior influência nas características de escoamento de um produto, a qual descreve a magnitude da resistência ao escoamento devido à força de cisalhamento dentro de um fluido, neste sentido as formas de cisalhamento podem ser definidas como taxa de deformação a qual a amostra é submetida. Quase todos os produtos desenvolvidos apresentaram consistência firme, semelhante à de iogurtes do tipo grego.

As formulações acrescidas de farinha de pinhão cozido e pinhão cozido apresentaram valores mais altos de viscosidade (Tabela 9), chegando até 160 dpas (decipascal). Este valor elevado de viscosidade é proporcional a maior firmeza observada nestas amostras que apresentaram maior dureza e concentração em sua composição final e inversamente proporcional aos resultados obtidos na análise de sinérese (Tabela 10). Este comportamento pode estar associado à gelatinização ou retrogradação do amido presente no pinhão durante o processo de cozimento, favorecendo assim a gelatinização dos iogurtes desenvolvidos.

Tabela 7: Resultado do pH dos iogurtes durante 28 dias de avaliação.

Período	iogurtes com Célula Intacta				iogurtes com Célula Lisada			
	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%
7 dias	4,40 ± 0,00 A c	4,46 ± 0,05 A c	4,73 ± 0,05 B b	5,06 ± 0,05 C a	4,06 ± 0,11 B e	5,13 ± 0,11 A a	4,20 ± B de	4,30 ± 0,00 A cd
14 dias	4,36± 0,05 AB c	4,50 ± 0,00 A bc	4,60 ± 0,00 C ab	4,76 ± 0,05 B a	3,73 ± 0,11 C e	4,06 ± 0,11 C d	3,70 ± 0,00 D e	4,00 ± 0,00 D d
21 dias	4,26 ± 0,05 B e	4,43 ± 0,05 A d	5,26 ± 0,05 A a	5,10 ± 0,00 B d	4,20 ± 0,00 B d	4,60 ± 0,00 B c	4,10 ± 0,00 C f	4,40 ± 0,00 C d
28 dias	4,33± 0,05 AB d	4,53 ± 0,05 A c	5,26 ± 0,05 A a	5,16 ± 0,11 A a	4,70 ± 0,00 A b	4,60 ± 0,00 A bc	4,60 ± 0,00 A bc	4,60 ± 0,00 B bc

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente, considerando amostras analisadas em triplicata. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0,05$). Letras maiúsculas indicam a comparação entre linhas, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre colunas.

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

Tabela 8: Resultado da acidez em % durante 28 dias de avaliação dos iogurtes.

Período	iogurtes com Célula Intacta				iogurtes com Célula Lisada			
	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%
1 dia	0,48± 0,08 Ce	0,31 ± 0,03 Cf	0,52± 0,02 Cde	0,32 ± 0,03 Cf	0,73± 0,05 Cbc	0,63± 0,05 Bcd	0,80 ± 0,00 Eb	0,96± 0,05 Ba
7 dias	0,82 ± 0,01 Bbc	0,66± 0,04 ABde	0,84± 0,01 Bbc	0,59± 0,03 Be	0,86 ± 0,05 Bb	0,73± 0,05 ABcd	0,90± 0,00 Db	1,03± 0,05 ABa
14 dias	0,81± 0,04 Bc	0,54 ± 0,05 Bd	0,91± 0,06 ABbc	0,76 ± 0,07 Ac	0,90± 0,00 Bbc	0,86 ± 0,05 Abc	1,00± 0,00 Cab	1,13 ± 0,05 Aa
21 dias	0,83± 0,01 Bcd	0,72± 0,01 Ae	0,89± 0,03 ABbc	0,75± 0,04 Ade	1,00± 0,00 Aa	0,86± 0,05 Abc	1,00 ± 0,00 Ba	0,93± 0,05 Bab
28 dias	1,06± 0,01 Aa	0,65± 0,09 Ad	0,98± 0,02 Aab	0,79± 0,02 Ac	1,00± 0,00 Aa	0,86± 0,05 Abc	1,00 ± 0,00 Aa	0,93 ± 0,05 Bab

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente, considerando amostras analisadas em triplicata. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0,05$). Letras maiúsculas indicam a comparação entre linhas, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre colunas.

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

Os valores da sinérese apresentaram aumento com o passar dos dias de armazenamento (Tabela 10), atingindo o máximo de $5,5 \pm 0,50\%$, para o iogurte com pinhão cozido e célula intacta no 28º dia. Este mesmo comportamento foi observado por Toledo (2013), ao estudar a elaboração de iogurtes de maracujá.

Pimentel (2009) sugere que o aumento da sinérese é devido ao decréscimo do pH durante a estocagem, o que provoca contração da matriz micelar de caseína, aumentando então a liberação do soro, e que valores de sinérese abaixo de 39% podem ser considerados satisfatórios. Nas formulações analisadas foi possível observar que a relação entre aumento da sinérese e diminuição de pH não ocorreu, tendo em vista que todas as formulações apresentaram alterações de pH nos 28 dias de avaliação.

Pode-se observar que o tempo de estocagem e a matéria-prima utilizada influenciaram significativamente na sinérese dos produtos finais. O volume de exudado apresentou a partir 14º dia, aumento gradativo em todas as amostras (Tabela 10), mesmo que o leite utilizado na produção dos leites fermentados tenha sido aquecido até 110°C , processo que está relacionado com a diminuição da sinérese no produto final. Além disso, o processo de retrogradação do amido também influencia na maior consistência do produto e, conseqüentemente, na diminuição da sinérese. Apenas na formulação produzida com farinha de pinhão cozido adicionado de células intactas não ocorreu nenhum tipo de liberação de soro durante o período de avaliação. Este resultado poderia ser justificado de acordo com Lima et al. (2011), pelo aumento de matéria sólida no leite fermentado que tende a diminuir a suscetibilidade à sinérese, além de influir nas características sensoriais dos produtos. No entanto foi observado que este padrão não se manteve, pois a formulação produzida com farinha de pinhão cozido e células lisadas apresentou comportamento diferente, porém similar às outras demais formulações onde a liberação de soro ocorreu de forma gradativa no decorrer do período de avaliação. Outro fator que pode ter ocasionado alterações no processo da sinérese foi a retrogradação do amido presente em grande quantidade no pinhão, causando um aumento na firmeza do produto com formação de gel e sinérese dos iogurtes.

Conforme discutido na introdução, a concentração de bactérias lácticas totais estabelecidas pela legislação é de 10^7UFC/g , (BRASIL, 2008). Assim, como pode ser visualizada na Tabela 10, a concentração desses microrganismos nos leites fermentados preparados com adição de farinhas de pinhão cru e cozido e adição de pinhão cru e cozido estavam em consonância com a mesma. Vale lembrar que a análise de contagem global não foi realizada nas formulações com adição de células

lisadas de *Lactobacillus acidophilus*, tendo em vista que não seria possível a realização das mesmas, pois estas passaram por um processo de lise celular antes da introdução destes micro-organismos nas diferentes formulações.

A Legislação vigente não estabelece critérios para a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva (SPC) em leites fermentados, embora seja um parâmetro importante, não só para a qualidade do produto, mas também para os consumidores, uma vez que a presença de SCP pode indicar a existência de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos, devido a práticas inadequadas de manipulação e de higienização dos materiais e equipamentos (Lamaita et al., 2005).

As contagens para SCP em todas as formulações avaliadas (Tabela 12) apresentaram valores abaixo do recomendado para outros alimentos, ficando em 100% das amostras $<1,0 \times 10^0$ UFC/mL, demonstrando que para este tipo de micro-organismos as formulações estavam com um ótimo padrão de qualidade. Resultado similar foi relatado por Andrade et al. (2015) em 40 amostras de bebidas lácteas fermentadas avaliadas.

Salmonella spp. não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Ausência em 100% dos iogurtes testados (Tabela 12). Resultados semelhantes foram descritos por Silva et al. (2012) que avaliaram amostras de iogurtes de produção caseira e de produção industrial, por Reis et al. (2014) que analisaram 105 amostras de derivados lácteos fermentados vendidos no Distrito Federal, e por Andrade et al. (2015), que avaliou 40 amostras de bebidas lácteas fermentadas vendidas em redes de supermercados de Belo Horizonte.

Tabela 9: Resultados percentuais obtidos de umidade, cinzas, proteínas e viscosidade.

Período	logurtes com Célula Intacta				logurtes com Célula Lisada			
	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%
Umidade	26,33± 1,35 A c	33,86± 1,20 A b	32,40± 0,90 A b	41,80± 1,70 A a	18,33± 1,15 B b	24,13± 0,15 B a	15,23± 0,20 B b	23,33 ± 2,89 B a
Cinzas	6,21 ± 0,33 A b	3,06± 0,11 A c	9,57 ± 0,35 A a	10,20± 0,40 A a	4,24 ± 1,57 A a	3,45± 2,08 A a	3,10± 0,10 B a	3,63 ± 0,12 B a
Proteínas	3,56± 0,33 A b	3,39 ± 0,43 A b	5,00± 0,00 A a	3,93± 0,40 A b	1,55± 0,82 B a	3,79± 2,41 A a	2,79± 1,83 A a	4,00 ± 0,30 A a
Viscosidade	12,00 ± 5,20 A b	116,70 ± 28,9 A a	11,00± 3,61 A b	116,70 ± 28,9 A a	8,00± 0,00 A	160,00 ± 0,00 A a	2,80± 0,00 B d	70,00 ± 0,00 B a

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente, considerando amostras analisadas em triplicata. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0,05$). Letras maiúsculas indicam a comparação entre linhas, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre colunas. Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

Tabela 10: Resultado em cm de sinérese em 28 dias de avaliação.

Período	logurtes com Célula Intacta				logurtes com Célula Lisada			
	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%	FPC 20%	FPCZ 20%	PC 20%	PCZ 20%
7 dias	1,66 cm ± 0,57 A a	0,00 cm ± 0,00 A d	2,00 cm ± 0,00 C a	1,00 cm ± 0,00 AB bc	0,50 mm ± 0,00 C cd	1,50 cm ± 0,00 B ab	1,80 cm ± 0,00 D a	0,50 mm ± 0,00 D cd
14 dias	1,73 cm ± 0,46 A bc	0,00 cm ± 0,00 A e	2,16 cm ± 0,28 B cd	3,00 cm ± 0,00 A a	0,86 mm ± 0,11 B d	1,50 cm ± 0,00 B c	2,00 cm ± 0,00 C bc	0,50 mm ± 0,00 C d
21 dias	1,96 cm ± 0,40 A c	0,00 cm ± 0,00 A e	2,66 cm ± 0,28 AB d	5,00 cm ± 0,00 A a	1,06 cm ± 0,11 B d	1,63 cm ± 0,15 AB c	2,50 cm ± 0,00 B b	1,00 cm ± 0,00 B d
28 dias	2,33 cm ± 0,57 A bc	0,00 cm ± 0,00 A f	3,00 cm ± 0,00 A b	5,50 cm ± 0,50 C a	1,50 cm ± 0,00 A dc	1,86 cm ± 0,11 A cd	2,70 cm ± 0,00 B b	1,00 cm ± 0,00 A e

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente, considerando amostras analisadas em triplicata. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p>0,05$). Letras maiúsculas indicam a comparação entre linhas, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre colunas. Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

De acordo com a legislação vigente, Instrução Normativa Nº 46 (BRASIL, 2007), o critério de aceitação para Coliformes Totais por grama (ou mL) em iogurte é $n=5$; $c=2$; $m=10$; $M=100$. No presente estudo, os valores de Coliformes Totais (35°C) foram considerados aceitáveis para 40% das amostras de iogurtes.

Os resultados da enumeração de Coliformes Totais demonstraram que 3/5 (60%) das amostras apresentaram contagens acima do limite máximo permitido na legislação que é de 10 UFC por mL do produto analisado (Tabela 12).

O valor elevado destes micro-organismos pode indicar práticas inadequadas de manipulação e higienização de materiais e equipamentos. O iogurte preparado com pinhão cru e célula lisada apresentou o melhor resultado ($<1,0 \times 10^0$ UFC/mL) frente às demais amostras analisadas. Resultado semelhante foi descrito por Reis et al. (2014) ao avaliar iogurtes produzidos no distrito federal, onde a média final encontrada ficou na casa de $1,4 \times 10^2$ UFC/mL.

Os valores de atividade antioxidantes das oito diferentes formulações de iogurtes acidófilos acrescidos de pinhão estão descritos na Tabela 13.

O uso de células de *Lactobacillus acidophilus* na forma lisada se justifica pela sua já comprovada atividade antioxidante. Assim como no organismo humano, as bactérias ácido-láticas possuem sistemas enzimáticos e não enzimáticos para lidar com os radicais livres, contudo, as enzimas antioxidantes desempenham um papel crítico nessa defesa (Driscoll et al., 2002). O sistema enzimático inclui a superóxido dismutase, tioredoxinaredutase, sistema de glutathione peroxidase/glutathione oxidase e NADH oxidase/NADH peroxidase (Amanatidou et al., 2001; Pophaly et al., 2012).

As bactérias ácido-láticas microaerófilas, como o *Lactobacillus acidophilus*, utilizam o oxigênio molecular para regenerar o NAD^+ a partir do NADH no processo fermentativo e da atividade da NADH oxidase (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). Essa reação produz peróxido de hidrogênio ou água e depende da capacidade da enzima em transferir 2 ou 4 elétrons. Quando o produto final é o peróxido de hidrogênio, ele é utilizado pela NADH peroxidase comoceptor final de elétrons e gera uma molécula de água (Guchte et al., 2002; Miyoshi et al., 2003; Saide & Gilliland, 2005).

Tabela 11: Atividade antioxidante (%) das amostras de iogurtes avaliados pelo método DPPH.

Inibição do DPPH	iogurtes com Célula Intacta				iogurtes com Célula Lisada			
	FPC	FPCZ	PC	PCZ	FPC	FPCZ	PC	PCZ
	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
50%	7	15	13	9	14	12	16	11
75%	6	18	13	10	13	14	16	11
100%	14	15	15	10	9	18	15	13

Fonte: Autoria própria (2019).

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, é possível observar que as amostras de iogurtes produzidos com farinha de pinhão cozido e pinhão cru em ambas as formulações apresentaram maior atividade antioxidante, no entanto outras amostras apresentaram valores semelhantes, não diferindo estatisticamente. Resultados semelhantes foram relatados por Pramiu & Fariña (2016), ao avaliarem leites fermentados elaborados com bactérias probióticas comercializados no município de Cascavel, PR. Já um estudo realizado por Giazzon e colaboradores (2009), encontrou valores entre 0,0 e 16,8 ao avaliarem diferentes partes e processos com o pinhão, sendo que o pinhão cru não apresentou atividade antioxidante enquanto o pinhão cozido apresentou valor de 9,5 em IC₅₀,o que demonstra que as sementes de Araucária apresentam uma baixa atividade antioxidante. Pelos valores encontrados pode-se inferir que o pinhão não é um bom antioxidante, o que pode ser explicado pela sua composição predominante de amido.

Tabela 12: Resultado da contagem de *Lactobacillus acidophilus*.

iogurte com Célula Intacta		iogurte com Célula Lisada	
FPC 20%	3,13 x 10 ⁹ UFC/g	FPC 20%	Não se Aplica *
FPCZ 20%	2,23 x 10 ⁹ UFC/g	FPCZ 20%	Não se Aplica *
PC 20%	4,7 x 10 ⁹ UFC/g	PC 20%	Não se Aplica *
PCZ 20%	5,1 x 10 ⁹ UFC/g	PCZ 20%	Não se Aplica *

* Análise não realizada pelo fato das amostras serem preparadas com células lisadas de *Lactobacillus acidophilus* que inviabiliza a contagem das mesmas.

Fonte: Autoria própria (2019).

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

Tabela 13: Resultado das análises microbiológicas de iogurtes acrescidos de pinhão cru e cozido ou de suas farinhas.

Amostra	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i> spp.	Coliformes totais
	Média	Média	Média
FPC 20% (célula Intacta)	<1,0 x 10° UFC/mL	Ausência em 25 g	15 UFC/mL
FPCZ 20% (célula Intacta)	<1,0 x 10° UFC/mL	Ausência em 25 g	11 UFC/mL
PC 20% (célula Intacta)	<1,0 x 10° UFC/mL	Ausência em 25 g	27 UFC/mL
PCZ 20% (célula Intacta)	<1,0 x 10° UFC/mL	Ausência em 25 g	6,2 UFC/mL
FPC 20% (célula Lisada)	<1,0 x 10° UFC/mL	Ausência em 25 g	<1,0 x 10° UFC/mL

Fonte: Autoria própria (2019).

Farinha de pinhão cru (FPC), Farinha de pinhão cozido (FPCZ), Pinhão cru (PC), Pinhão cozido (PCZ).

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão da atividade antioxidante nas amostras de iogurte.

Diluições	Média geral das 8 formulações
50%	12,15 ± 2,80 A
75%	12,62 ± 3,46 A
100%	13,62 ± 2,73 A

Fonte: Autoria própria (2019).

Média e desvio padrão.

4. Avaliação sensorial

Participaram do teste de aceitabilidade sensorial 50 julgadores. Os resultados do teste de ordenação estão apresentados na Tabela 15. A ordenação foi feita atribuindo a maior nota à amostra preferida e se realizou a soma das ordens para cada amostra, obtendo-se a média geral de cada formulação.

Na impressão global, as formulações de iogurte apresentaram escores médios entre 3,00 e 7,00, situando-se entre os termos “Desgostei regularmente” e “Gostei regularmente”, quando do final da avaliação da aceitabilidade sensorial.

Pode-se observar pelos resultados das médias obtidas que as formulações 650 e 931 ambas produzidas com farinha de pinhão cozido apresentaram a menor nota na avaliação pelos consumidores. Este fato pode estar associado à composição final do iogurte que se mostrou mais consistente, grosseira e com presença de grânulos provenientes da farinha, diferindo das características gerais dos iogurtes (consistência cremosa) comercializados e conhecidos pela maioria dos consumidores. Cunha et al. (2009) destacam que as características sensoriais como sabor, textura e aparência estão entre os principais determinantes na aquisição, consumo, aceitação e preferência dos produtos alimentícios por diferentes faixas etárias, além de contribuírem para o monitoramento de sua qualidade.

Ainda foi possível observar que todas as formulações adicionadas com pinhão cru ou sua farinha obtiveram as melhores notas na média geral, 890 (média 7,24), 843 (média 7,36), 636 (média 7,66) e 268 (média 7,68), tanto para iogurtes com adição de células intactas quanto lisadas, sendo que a formulação de leite fermentado com pinhão cru e células lisadas obteve a melhor nota na média geral (nota 7,68 – “Gostei regularmente”). Este leite fermentado apresentou uma textura mais homogênea, levemente líquida, com coloração levemente caramelada e sem a presença de grânulos. Características observadas na grande maioria dos iogurtes disponíveis no mercado para os consumidores.

Foi realizada uma análise de variância para verificar se existia diferença entre os iogurtes e verificou-se que existe diferença significativa a 5% de significância ($p < 0,05$)

Tabela 15: Média das notas da análise sensorial.

Médias	Produto equivalente
7,6 A	iogurte com pinhão cru mais células lisadas
7,6 A	iogurte com farinha de pinhão cru mais células intactas
7,3 A	iogurte com pinhão cru mais células intactas
7,2 A	iogurte com farinha de pinhão cru mais células lisadas
4,4 B	iogurte com pinhão cozido mais células lisadas
3,9 B	iogurte com pinhão cozido mais células intactas
3,8 B	iogurte com farinha de pinhão cozido mais células intactas
3,8 B	iogurte com farinha de pinhão cozido mais células lisadas

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente, considerando amostras analisadas em triplicata. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Foi possível observar que não houve diferença significativa entre as amostras avaliadas produzidas com adição de pinhão cru e a farinha de pinhão cru, assim como não houve diferença entre os iogurtes produzidos com pinhão cozido e a farinha de pinhão cozido, no entanto, ocorreu diferença entre os produtos produzidos com pinhão cru e pinhão cozido e suas respectivas farinhas como está demonstrado na Tabela 15. As formulações contendo pinhão cru ou farinha de pinhão cru apresentaram melhor aceitação pelos consumidores frente àquelas produzidas com pinhão cozido e farinha de pinhão cozido.

5. Conclusão

A adição de pinhão cru e cozido e suas respectivas farinhas no processamento de iogurtes alterou significativamente alguns dos parâmetros químicos e físico-químicos, como pH, viscosidade e sinérese dos produtos avaliados, ficando muitos destes fora dos padrões recomendados em legislação para iogurtes. A presença de pinhão e farinhas de pinhão alterou as características sensoriais dos iogurtes, principalmente os produzidos com farinha de pinhão cozido, as quais apresentaram consistência mais sólida e presença de grânulos, sendo o iogurte desenvolvido com pinhão cru o que apresentou melhor aceitação pelos consumidores, estando os resultados satisfatórios e dentro do esperado durante os dias de avaliação.

Quanto à contagem total de bactérias lácticas a legislação foi atendida, com o mínimo de 10^9 UFC/g durante avaliação das amostras. Este parâmetro não foi verificado nas amostras produzidas com células lisadas, pois apenas estava sendo avaliada a presença do *Lactobacillus acidophilus*, e não de outras culturas lácteas.

Dentre os parâmetros microbiológicos avaliados foi possível detectar apenas a contaminação por coliformes totais (35°C) sem, no entanto, inviabilizar o consumo do produto.

A avaliação da capacidade antioxidante não apresentou resultados muito significativos comparados com outros materiais avaliados, estando dentro do valor descrito para avaliação da atividade antioxidante de produtos contendo Araucária ou mesmo das suas sementes.

Na análise sensorial, todos os produtos avaliados apresentaram variação estatística, todavia o produto com adição de pinhão cru e célula lisada apresentou o maior potencial mercadológico, recebendo a maior nota entre as formulações avaliadas. Além disso, este produto se encontra ainda dentro dos parâmetros

estabelecidos para leites fermentados, apresentando bons resultados de pH, acidez, proteína, sinérese, concentração de bactérias lácteas e microbiológicas. Levando-se em conta todos os parâmetros positivos em relação a este produto, pode-se acreditar que este leite fermentado é um potencial candidato a ser produzido de forma industrial e chegar ao mercado consumidor como um produto inovador.

6. Referências bibliográficas

1. Amanatidou, A., Smid, E.J., Bennik, M.H.J., Gorris, L.G.M. Antioxidative properties of *Lactobacillus sakei* upon exposure to elevated oxygen concentrations. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 203, n. 1, p. 87–94, setembro. Oxford, England, UK, 2001.
2. Andrade, E.H.P., Silva, N.M.A., Resende, M.F.S., Souza, M.R., Fonseca, L.M., Cerqueira, M.M.O.P., Penna, C.F.A.M., Leite, M.O. Microbiological and physical-chemical characteristics of fermented milk beverages. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.67 nº 6. Novembro/dezembro, Belo Horizonte, MG, 2015.
3. Antunes, A.R. & Fariña, L.O. WPC35 e estabilizante para iogurte: há vantagens neste sinergismo? **ITAL** – Instituto de Tecnologia e Alimentos. Campinas, SP, 2013.
4. Beninca, C., Martins, C., Souza, A.A.D.F., Bechel, B.V., Antochesk, E. Análise sensorial e caracterização físico-química de iogurte Prebiótico com polpa de *Physalis sp.* **4º Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação do IFSC**. Chapecó, SC, 2014.
5. BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC Nº 12, de 02 De Janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 de janeiro de 2001.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. Instrução Normativa n.16, 23 de agosto 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de agosto de 2005.
7. BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de outubro de 2007.

8. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas pela RDC. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. Atualizado em julho/2008.

9. BRASIL. Instrução Normativa Nº 44, de 15 de dezembro de 2015. MAPA - Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2015.

10. Carvalho, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – **EMBRAPA** – Colombo, PR, 1994.

11. Conto, L.C. & Ide, G.M. Avaliação físico-química e sensorial de conservas de pinhão (*Araucaria angustifolia*) processadas em diferentes meios de acidificação. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*. V.11 n.2 Janeiro/Abril, Guarapuava, PR, 2015.

12. Cordenunsi, B.R., Menezes, E.W., Genovese, M.I., Colli, C., Souza, A.G., Lajolo, F.M. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 52, 3412–3416, São Paulo, SP, 2004.

13. Costa, M.P., Balthazar, C.F., Moreira, R.V.B.P., Cruz, A.G., Júnior, C.A.C. Leite Fermentado: Potencial Alimento Funcional. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.9, N.16; p. 1387, Goiania, GO, 2013.

14. Cunha, C.S., Castro, C.F., Pires, C.V., Pires, I.S.C., Halboth, N.V., Miranda, L.S. Influência da textura e do sabor na aceitação de cremes de aveia por indivíduos de diferentes faixas etárias. **Alimentos e Nutrição**. V.20, n.4, p. 573-580, outubro/dezembro, Araraquara, SP, 2009.

15. Driscoll, K.E., Carter, J.M., BORM, P.J. Antioxidant defense mechanisms and the toxicity of fibrous and nonfibrous particles. **Inhalation Toxicology**, [s.l.], v. 14, ed. 1, p. 101-118, England, UK, 2002.

- 16.Fortuna, J.L. **Contagem Padrão em Placas**. Disponível em: scribd.com. UNEB – Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA, 2008.
- 17.Giazzon, I., Michelon, F., Spada, P.D.S., Salvador, M. Atividade antioxidante de sementes de *Araucaria angustifolia*. **XVII Encontro de Jovens Pesquisadores**. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Universidade de Caxias do Sul. Setembro, Caxias do Sul, RS, 2009.
- 18.Guchte, M. van, Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 82, n. 1/4, p. 187-216, agosto. Amsterdam, Netherlands, 2002.
- 19.Haenlein, G. F.W. About the evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**. v. 68, n. 1-2, p. 3-6, Itasca, IL, 2007.
- 20.Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. 11:506–14. Jun 10. 2014.
- 21.INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. V. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. IMESP, 1985. São Paulo, SP, 2008.
- 22.Lai, Y., Tsai, S., LEE, M. Isolation of exopolysaccharide producing *Lactobacillus* strains from sorghum distillery residues pickled cabbage and their antioxidant properties. **Food Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 1231-1236, agosto. South Korea, KOR, 2014.
- 23.Lima, N. N. Farinha de Pinhão. **Folha de Londrina on-line**, Paraná, 2006.
- 24.Lima, S.C.G., Oliveira, P.D., Lourenço Júnior, J.B., Rodrigues, L.S., Neres, L.S. Efeito da adição de diferentes sólidos na textura, sinérese e característica sensorial de iogurte firme. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Novembro/Dezembro, nº 383, 66: 32-39, Juiz de Fora, MG, 2011.

- 25.Maia, L.& Santos, Â. Alimentos e suas ações em sistemas fisiológicos. **Veredas Favip**. v. 3, n. 1/2, p. 24-34, Vale do Ipojuca, PE,2006.
- 26.Marquesini, N.R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1995.
- 27.Medeiros, F. O., Alves, F. G., Lisboa, C. R., Martins, D. D. S., Burkert, C. A. V., Kalil, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração b-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, São Paulo, SP, 2008.
- 28.Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J.J., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P., Azevedo, V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n.4, p. 348–359, December. Ribeirão Preto, SP, 2003.
- 29.Moreira, S.R., Schwan, R.F., Carvalho, E.P., Ferreira, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras - MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** [online], vol.19, n.1, pp.147-152, Campinas, SP, 1999.
- 30.Nascimento, T.C., Ferreira, P.V.S., Bento, C.R., Vale, R.C., Oliveira, S.P., Martins, J.M. Caracterização físico-química e microbiológica de iogurte grego produzido por uma agroindústria do município de guarani, MG. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; XCIGR Section International Technical Symposium. 24 a 27 de outubro, FAURGS – Gramado, RS, 2016.
- 31.Neves, L. C. M. Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. **Dissertação de tese de doutorado**. Universidade de São Paulo. Pag. 259-284, São Paulo, SP, 2003.
- 32.Oliveira, E.A.M., Soldi, C.L., Caveião, C., Sales, W.B. Contagem de Bactérias Lácticas Viáveis em Leites Fermentados. **Revista Univap** - v. 24, n. 46, dez. São José dos Campos, SP, 2018.
- 33.Pimentel, T.C. Iogurte probiótico com inulina como substituto de gordura. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

- 34.Pophaly, S.D., Singh, R., Kaushik, J., Tomar, K. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.111-114, agosto. England, UK, 2012.
- 35.Pramil, D.C. & Fariña, L.O. Avaliação da atividade antioxidante de leites fermentados elaborados com bactérias probióticas e comercializados em Cascavel – PR.II **EAICTI – II Encontro Anual de Iniciação Científica**. 29 e 30 de setembro. UNIOESTE – Campus Cascavel, Cascavel, PR, 2016.
- 36.Reis, D.L., Couto, E.P., Ribeiro, J.L., Nero, L.A., Ferreira, M.A. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3161-3172, novembro/dezembro, Londrina, PR, 2014.
- 37.Saide, J.A.O. & Gilliland, S.E. Antioxidative Activity of Lactobacilli Measured by Oxygen Radical Absorbance Capacity. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 88, n. 4, p.1352-1357, abril. Cincinnati, Ohio, USA, 2005.
- 38.Sanchez, B., Reyes-Gavilán, C.G.L., Margolles, A., Gueimonde, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**. v. 62, p. 1-10, EUA, 2009.
- 39.Santos, C.T., Marques, G.M.R., Fontan, G.C.R., Fontan, R.C.I., Bonomo, R.C.F., Paulo Bonomo, P. Elaboração e caracterização de uma bebida láctea fermentada com polpa de umbu (*Spondias tuberosa* sp.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.8, n.2, p.111-116, Campina Grande, PB, 2006.
- 40.Silva, L.C., Machado, T.B., Silveira, M.L.R., Rosa, C.S., Bertagnolli, S.M.M. Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria – RS. **Ciências da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 111-120, Santa Maria, RS, 2012.
- 41.Silva, T.R., Reis, C.G., Alves, J.E.A., Oliveira, C.A. Elaboração e caracterização físico-química de iogurte adicionado de polpa do fruto do xique-xique (*Pilosocereus gounellei*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos / Ciência de Alimentos**. **69ª Reunião Anual da SBPC** - 16 a 22 de julho de 2017 - UFMG - Belo Horizonte, MG, 2017.

- 42.Singh, R. P., Heldman, D.R. **Introduction to food engineering**. 4 ed. Academic Press, San Diego, California, USA, 1993.
- 43.Stone, H. & Sidel, J.L. Descriptive analysis. In: Stone, H.; Sidel, J. L. **Sensory evaluation practices**. Academic Press. p. 202-226, London, England, 1985.
- 44.TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ª edição revisada e ampliada. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP, 2011.
- 45.Talwalkar, A. & Kailasapathy, K. The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Current Issues in Intestinal Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 1–8, março. Japan JP, 2004.
- 46.UFRJ. **Bromatologia em Saúde**. Blog do LabConsS - Laboratório de Vida Urbana, Consumo & Saúde.Grupo PET-SESu/Farmácia & Saúde Pública da UFRJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.
- 47.Zayed, G. & Winter, J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 44, n. 3-4, p.362-366, dezembro. Heidelberg, Alemanha, 1995.

Capítulo 3. Artigo: Desenvolvimento de Queijo Cremoso Frescal Acrescido de Pinhão (*Araucaria angustifolia*)

Resumo - Queijo é um dos alimentos mais nutritivos que se conhece, sendo um dos alimentos mais consumidos pela população. Assim como o queijo, o pinhão (semente *Araucaria angustifolia*) também apresenta uma composição nutricional única. Com estas informações o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um queijo frescal acrescido de pinhão cozido ou sua farinha e avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas deste novo produto, além de analisar a aceitação sensorial. A caracterização físico-química deu-se através das seguintes análises: pH, umidade, resíduo mineral fixo, sólidos totais, proteínas, fibra bruta, carboidratos, acidez, percentual de cloretos (NaCl) e lipídeos. Foram determinados índices de coliformes totais e coliformes termotolerantes, pesquisa de *Salmonella spp.*, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e bolores e leveduras. Os resultados das análises físico-químicas apresentaram-se de acordo nos parâmetros pH, acidez, gorduras, cloreto e fibras. A umidade observada enquadrou os produtos como queijos com muita alta umidade, enquanto o parâmetro lipídeo os classificou como queijos desnatados (gordura abaixo de 10%) em 100% das amostras de acordo com legislação. O valor de proteínas estava abaixo do recomendado em todos os produtos, já a avaliação de carboidratos demonstrou que os queijos apresentavam valores elevados devido à presença de pinhão na composição. As avaliações microbiológicas não evidenciaram desenvolvimento microbiano para nenhum parâmetro pesquisado. A avaliação sensorial demonstrou que os queijos produzidos com adição de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido em sua composição apresentaram boa aceitação pelos consumidores, sendo fortes candidatos a um produto inovador para ser produzido e comercializado em grande escala.

Palavras chave: Avaliação composicional, desenvolvimento novos produtos, queijo frescal.

1. Introdução

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e B. É um dos alimentos mais nutritivos que se conhece: um queijo com 48% de gordura contém

cerca de 23 a 35% de proteína, o que significa que, em termos de valor protéico, 210 g desse produto equivale a 300 g de carne. A composição do queijo varia de acordo com o tipo, tempo de maturação, composição do leite utilizado etc, e pode apresentar diferentes sabores e textura, existindo assim uma variedade muito grande de tipos (Tiba & Ribeiro, 2010). Queijo é um produto lácteo produzido em grande variedade tanto de sabor quanto de forma em todo o mundo (Paula et al., 2009). O queijo é um derivado lácteo obtido da coagulação do leite (Oliveira et al., 2016).

É um meio de conservação do leite, pois em média são gastos dez litros de leite para produzir um quilo de queijo. Sendo assim, ele é a maneira mais simples de se consumir as propriedades nutritivas do leite, sendo indicado em dietas alimentares devido a sua alta digestibilidade quando comparado a outros alimentos (Apolinário et al., 2014). Existem pelo menos 1.000 variedades diferentes do produto, sendo que as principais famílias são representadas pelos queijos Holandeses, Suíços, de massa filada, Cheddar e Parmesão, os quais representam mais de 80% da produção mundial (Paula et al., 2009).

Devido suas grandes vantagens nutricionais, o queijo possui grande importância nos hábitos de consumo da população brasileira, sendo parte integrante dos hábitos e da cultura nacional (Apolinário et al., 2014). Todas as variedades podem ser classificadas em três superfamílias, com base no método de coagulação do leite: coagulação enzimática, que representa aproximadamente 75% do total dos queijos produzidos; coagulação ácida ou láctica do leite; e a coagulação mista (Paula et al., 2009).

Entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997). É classificado como um queijo semi-gordo, de muita alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico Geral de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996; BRASIL, 2004).

O queijo Minas frescal também é um queijo popular devido ao seu alto rendimento de produção, processamento simples e baixo custo ao consumidor (Oliveira et al., 2016). Por possuir maior rendimento, processamento simples e ausência de maturação do produto final, a produção do queijo Minas Frescal é uma importante atividade da indústria queijeira, que proporciona um retorno rápido dos investimentos e menores custos para o produtor (Apolinário et al., 2014).

A qualidade dos produtos lácteos, a manutenção das suas características sensoriais e a segurança alimentar são essenciais aos consumidores (Oliveira et al., 2016). Por não possuir período de maturação, o queijo frescal é um produto perecível que deve ser consumido rapidamente, sendo necessária sua manutenção em ambiente refrigerado (Apolinário et al., 2014).

Já o pinhão por sua vez é uma amêndoa rica em reservas energéticas, servindo para a alimentação humana, de animais domésticos (principalmente suínos) e da fauna Silvestre (Acorsi, et al., 2008; David & Silochi, 2010; Garcia, 2012), e embora não exista uma cultura industrial de utilização desta matéria-prima, o pinhão tem grande importância comercial e gera lucros em suas regiões produtoras. Por este motivo o desenvolvimento de produtos que utilizem o pinhão como ingrediente na produção de alimentos industrializados é muito importante.

Devido à grande apreciação e consumo de queijo pela população em geral, e ao pouco uso do pinhão em alimentos prontos, justifica-se o desenvolvimento de um novo produto que agregue as características destes dois alimentos, surgindo assim um novo alimento com sabor e características próprias, além de agregar valor nutricional e financeiro a este produto desenvolvido. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um queijo frescal cremoso acrescido de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido, avaliando as características físico-químicas e sensoriais deste novo produto com caráter inovador pela presença da matéria-prima pinhão em sua composição.

2. Metodologia

Os pinhões, sementes da *Araucaria angustifolia*, foram adquiridos na região rural da cidade de Guarapuava /PR, diretamente dos produtores, sendo conservados em temperatura ambiente (média 18°C) até o processamento dos novos produtos.

Foram preparadas diferentes formulações para verificar qual destas apresentava melhor característica de um queijo cremoso frescal. Foram preparadas 4 diferentes formulações, todas com adição de farinhas de pinhão cozido e pinhão cozido. As farinhas de pinhão foram produzidas de acordo com o descrito no capítulo 1, sendo utilizados pinhões que passaram por processo de cozimento. Os pinhões, após cozimento a 110°C em panela de pressão, foram descascados manualmente e triturados em liquidificador doméstico para obtenção de uma massa de menor diâmetro, sendo esta massa triturada distribuída em formas de alumínio e levadas para estufa de convecção simples, com temperatura controlada com média

de $50^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para secagem até atingirem um valor de umidade de, no máximo 15%, sendo então novamente trituradas em liquidificador para obtenção de uma massa de menor diâmetro, mais característico como uma farinha.

As quatro diferentes formulações estão descritas na Figura 14. Todas as formulações foram realizadas seguindo a metodologia para queijo fresco descrita por Castanheira (2010), com adaptações.

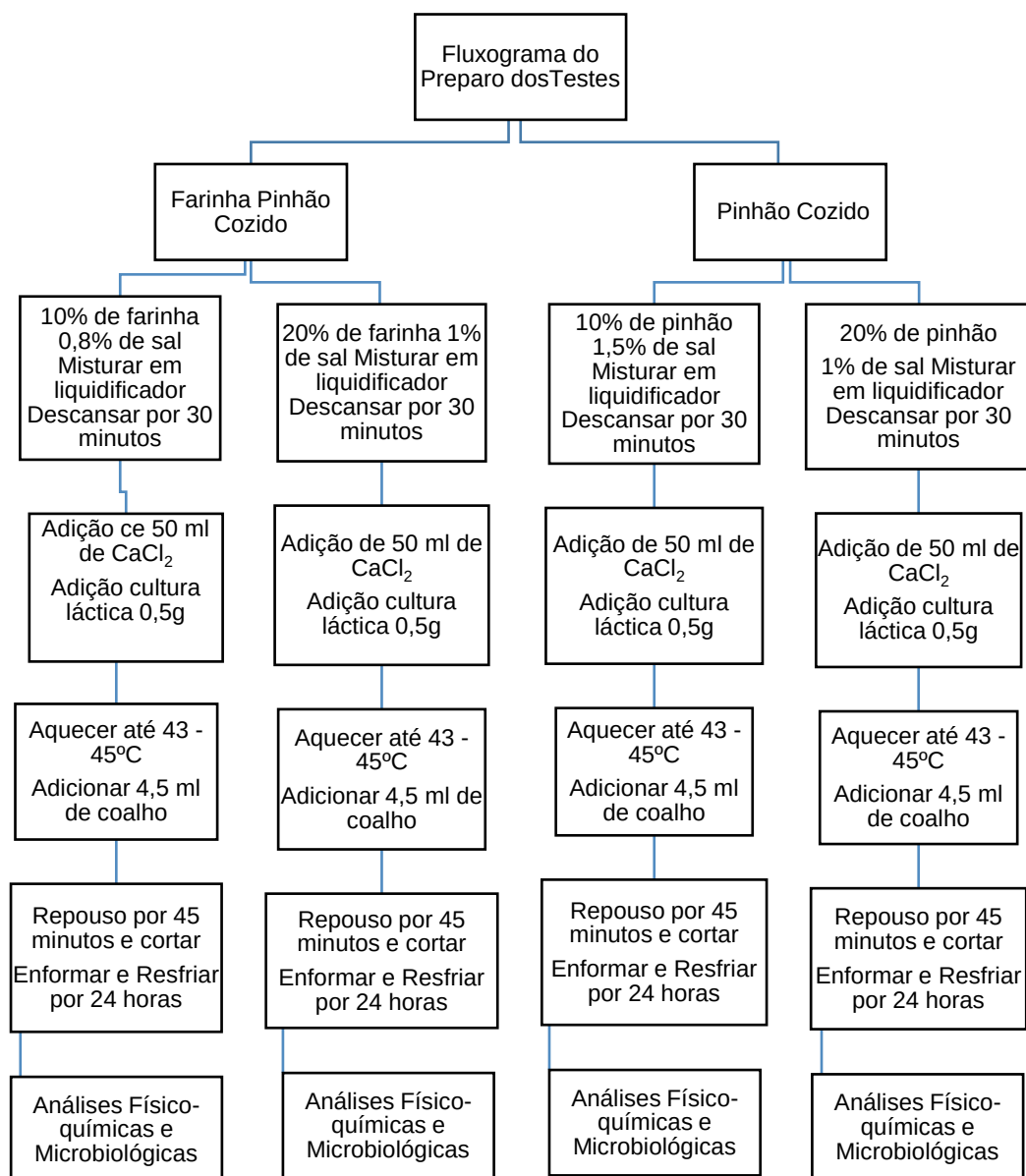


Figura 14: Fluxograma de produção de queijos com adição de pinhão cozido e farinha de pinhão cozido.

Fonte: Autoria própria (2019).

A primeira formulação foi preparada com 20% de pinhão cozido. Foram misturados 5 L de leite mais 1kg de pinhão cozido e batidos em liquidificador para

homogeneização da mistura, que foi deixada em repouso por cerca de 30 minutos para que ocorresse a hidratação do pinhão. Em seguida, foi adicionado CaCl_2 a 50% (50 ml) e 50g (1%) de sal. Também foi adicionada à mistura 0,5 g de cultura lática (0,01%). A mistura então foi aquecida em panela até 43 ± 2 °C, sendo então acrescentados 4,5 mL de coalho. Após atingir a temperatura desejável a panela foi tampada e a mistura foi deixada em repouso por 45 minutos. Decorrido este período a mistura encontrava-se coagulada, sendo então a massa cortada lentamente, com auxílio de escumadeira de uso doméstico, até que a massa apresentasse grânulos do tamanho de grãos de milho, sendo em seguida distribuída em formas de tamanhos iguais prensadas para retirada do excesso de soro e acondicionadas dentro da geladeira por 24 horas (Figura 15). As outras três formulações de queijos preparadas seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente diferenciando-se da seguinte maneira: Formulação 2 preparada com 10% de farinha de pinhão cozido e 0,8% de sal; Formulação 3 preparada com 20% de farinha de pinhão cozido e 1% de sal; Formulação 4 preparada com 10% de pinhão cozido e 1,5% de sal.



Figura 15: Processo de produção de queijos acrescidos de farinhas de pinhão

Fonte: Autoria própria (2019).

Todos os queijos obtidos após o período de 24 horas foram virados e deixados por igual período em resfriamento em geladeira, com no máximo 8°C. Assim que terminaram às 48 horas em geladeira, os produtos foram embalados e procederam-se as análises físico-químicas e microbiológicas (Figura 16).



Figura 16: Queijos acrescido de farinha de pinhão cozido.

Fonte: Autoria própria (2019).

2.1. Análises físico-químicas dos queijos

O processamento dos queijos foi realizado nas dependências do Laboratório de Alimentos, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Cascavel - PR. Tendo sido feitas em duplicata, conforme o que se segue:

O valor de pH foi determinado em potenciômetro de bancada. A determinação de umidade foi realizada, durante 5 horas em estufa a 105 ± 3 °C. Resíduo mineral fixo em mufla a 550°C. O teor de sólidos totais foi estimado por diferença, subtraindo de 100 o valor da umidade, de acordo com os procedimentos descritos pela Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006).

O teor de proteínas foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. O teor de fibra bruta, através de digestão do material em meio químico. Carboidratos foram determinados pela diferença descontando de 100 o valor das demais análises. A determinação de acidez em ácido láctico, foi realizada nas amostras em tempo de 0 (zero) dias, todas as análises foram realizadas seguindo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

A determinação do percentual de cloretos (NaCl) seguiu a metodologia descrita no livro Manual Básico de Controle de Qualidade de Leite e Derivados (Castanheira, 2010).

A determinação de lipídeos foi realizada de acordo com as normas do Instituto Adolf Lutz (2008), através de butirômetro de leite.

2.2 Análises microbiológicas dos queijos

Todas as quatro diferentes formulações de queijos acrescidos de farinha de pinhão cozido e pinhão cozido (10% e 20%) foram avaliadas quanto a sua qualidade microbiológica. As amostras de queijo após serem produzidas foram congeladas e no momento da realização da análise estavam sob resfriamento. O congelamento dos produtos prontos se deu pela questão de conservação destes para que fossem mantidas as características de cada produto.

Para a realização da avaliação microbiológica foram pesadas 25 gramas de cada amostra e homogeneizadas em 225 ml de solução salina estéril. A partir desta diluição inicial foram preparadas séries de diluições para realização das análises conforme metodologia descrita por Castanheira (2010)

As amostras foram submetidas às análises microbiológicas de determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, através de teste presuntivo em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST – Micromed) e, posteriormente, Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB – Himedia) e Caldo *E. coli* (EC – Himedia), respectivamente. De cada tubo contendo caldo EC com produção de gás, foi estriada uma alçada em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB – Himedia). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas; pesquisa de *Salmonella spp.*, com presença ou ausência, em 25 g de amostra, onde uma porção de 25 gramas das amostras homogeneizadas foi transferida para um frasco estéril, no qual foi adicionado 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (Caldo Lactosado), sendo a mistura homogeneizada e deixada em repouso por 1 hora a temperatura ambiente para a verificação do pH (ideal $6,8 \pm 0,2$), e consequente ajuste do mesmo com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, se necessário. Posteriormente, a incubação foi feita a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após este período, realizou-se o enriquecimento seletivo, sendo transferidas alíquotas de 0,1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassilidis e 1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Tetrationato. Estes foram incubados a 42 ± 2 °C por 24 horas e 35 ± 2 °C por 24 horas, respectivamente; contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) utilizando-se Ágar Baird Parker (BP – Himedia) sendo as placas incubadas a 37°C por 24 horas, as colônias vermelho-violetas foram contadas como *S. aureus* e bolores e leveduras na qual foram pesadas assepticamente 25 gramas de amostra e homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1%, foram realizadas diluições seriadas (10-1, 10-2, 10-3 e 10-4) preparadas em tubos estéreis contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Posteriormente, cada diluição foi vertida em placas de Petri com Ágar Sabouraud Dextrose contendo 9 mL de cloranfenicol.

Em seguida, as placas foram incubadas a 36 °C durante 48 horas, ao fim do qual a leitura foi realizada. Os resultados das análises microbiológicas foram comparados aos padrões estabelecidos pela Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.

2.3 Análise sensorial

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), sob número de registro CNAE – 02311712.7.0000.0107.

Foi recrutado um painel de consumidores não treinados, perfazendo um total de 35 participantes, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 60 anos, entre alunos, professores e demais funcionários da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. As quatro diferentes formulações de queijos acrescidos de farinhas de pinhão cozido ou pinhão cozido foram apresentadas aos consumidores de forma aleatória. Os queijos foram servidos em pequenas porções, codificados com três dígitos aleatórios, contendo, aproximadamente, 5 g do produto. Utilizou-se o teste de atribuição de preferência para as amostras conforme: Atribua o nº 1 para a amostra de maior preferência, 2 para a segunda de maior preferência (Figura 23 em Anexo 2), e assim sucessivamente.

Os provadores receberam uma amostra de cada produto enumerada de forma aleatória por sorteio sendo orientados a realizarem a degustação da seguinte forma: 1º eles deveriam provar uma das amostras de forma aleatória e atribuir uma nota para este produto; 2º após provar a primeira amostra deveriam tomar um pouquinho de água e aguardar 30 segundos antes de provarem o próximo produto, e proceder desta mesma maneira até que tivessem degustado todas as diferentes formulações.

Depois de ocorrida a análise de preferência, foi realizada uma análise pareada de preferência comparando um queijo que se encontrava congelado e um queijo que se encontrava apenas resfriado, com o intuito de verificar se o processo de resfriamento e ou congelamento interferia na qualidade sensorial do produto.

Os julgadores receberam uma ficha, conforme a Figura 24 (Anexo), duas amostras codificadas e um copo com água. Os mesmos foram orientados a enxaguar a boca com água, antes do início do teste, pediu-se também que eles lavassem as papilas após cada avaliação e esperassem de 30 - 40 segundos entre as provações das amostras.

2.4 Análise Estatística dos dados

O experimento foi analisado segundo delineamento inteiramente casualizado com, no mínimo, três repetições para as análises físico-químicas, sendo os dados submetidos ao programa Minitab® versão 17 para obtenção das médias e desvio padrão.

Os resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) a 5% de significância. A indicação de diferença significativa entre os grupos foi realizada por teste de Comparações de Múltiplas (Teste de Tukey) a 5% de significância, por comparação de tratamento até completar todas as combinações possíveis. Os grupos que foram considerados estatisticamente iguais foram agrupados e comparados aos demais.

3 Resultados e discussão

Com relação à análise de pH, houve uma variação de $5,15 \pm 0,02$ a $6,72 \pm 0,00$ entre as amostras analisadas (Tabela 16). Esta variação pode ocorrer devido à concentração de pinhão utilizado para a fabricação do queijo, e também pelo fato de os lotes terem sido fabricados em dias diferentes. Na pesquisa realizada por Sandri et al. (2015) ao estudarem queijos minas frescal produzidos no estado do Mato Grosso, observou-se um pH entre 4,50 e 6,80, valores semelhantes aos encontrados nesta avaliação. Já Schuh et al. (2016), encontraram em suas pesquisas com queijos coloniais valores de pH entre 5,58 e 6,06.

O pH é considerado uma determinação importante para caracterizar queijos devido à sua influência na textura, sabor, na atividade microbiana e na maturação, já que ocorrem reações químicas que são catalisadas por enzimas provenientes do coalho e da microbiota, que dependem do pH para o seu desenvolvimento (Schuh et al., 2016)

A acidez titulável determina a quantidade de ácido láctico presente nos produtos lácteos. O uso desse parâmetro em produtos lácteos necessita conhecer todo o fluxo da produção para interpretar seus resultados. Durante o processamento a acidez titulável é adotada para avaliar a evolução do desenvolvimento de ácido láctico pelas bactérias '*starters*'. Após a enformagem e salga iniciam o metabolismo de hidrólise dos componentes do queijo, alterando o teor de acidez à medida que este é submetido à estocagem e maturação (Ricardo et al., 2011).

Tabela 16: Valores de pH em 21 dias de análise.

Período	Amostras de queijo			
	FPCZ 10%	FPCZ 20%	PCZ 10%	PCZ 20%
0 dias	6,47 ± 0,02 A c	5,71 ± 0,03 A d	6,72 ± 0,00 A a	6,61 ± 0,01 A b
7 dias	5,85 ± 0,01 B c	5,15 ± 0,02 B d	6,08 ± 0,02 B b	6,37 ± 0,01 B a
14 dias	5,20 ± 0,01 C c	5,39 ± 0,02 C d	5,68 ± 0,01 C b	5,80 ± 0,01 C a
21 dias	5,17 ± 0,00 C d	5,40 ± 0,02 D c	5,49 ± 0,03 D b	5,47 ± 0,01 D a

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam a comparação entre linhas, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre colunas.

Queijo acrescido de farinha de pinhão cozido 10% (FPCZ 10), Queijo acrescido de farinha pinhão cozido 20% (FPCZ 20), Queijo acrescido de pinhão cozido 10% (PCZ 10), Queijo acrescido de farinha de pinhão 20% (PCZ 20).

Tabela 17: Média dos valores da acidez titulável* de queijos acrescidos de farinha de pinhão cozido ou de pinhão cozido.

Período	Amostras de queijo			
	FPCZ 10%	FPCZ 20%	PCZ 10%	PCZ 20%
0 dias	0,21 ± 0,03 D b	0,40 ± 0,02 C a	0,23 ± 0,03 C b	0,22 ± 0,01 C b
7 dias	0,36 ± 0,05 C c	0,60 ± 0,02 A a	0,37 ± 0,03 B b	0,37 ± 0,01 A ab
14 dias	0,53 ± 0,04 B a	0,52 ± 0,01 B a	0,46 ± 0,01 A b	0,40 ± 0,03 A b
21 dias	0,65 ± 0,02 A a	0,57 ± 0,02 AB b	0,41 ± 0,01 AB c	0,30 ± 0,01 B d

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras maiúsculas indicam a comparação entre linhas, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre colunas.

Queijo acrescido de farinha de pinhão cozido 10% (FPCZ 10), Queijo acrescido de farinha pinhão cozido 20% (FPCZ 20), Queijo acrescido de pinhão cozido 10% (PCZ 10), Queijo acrescido de farinha de pinhão 20% (PCZ 20).

* Acidez (% g de ácido láctico/g de queijo)

Dependendo das condições de exposição, os queijos podem sofrer alterações tornando-se mais ácidos. Neste estudo, os queijos elaborados com farinhas de pinhão cozido e pinhão cozido apresentaram acidez entre $0,21 \pm 0,03$ e $0,60 \pm 0,02$ % (Tabela 17). Esses resultados foram próximos aos determinados por Ricardo et al. (2011), que obtiveram valores entre 0,18 a 1,42 % ao analisarem queijos minas frescal artesanal comercializados em Londrina (PR) e Fariña et al. (2008), ao avaliarem queijos coloniais produzidos em Céu Azul (PR) encontrando valores entre 0,13 e 0,66%.

Os resultados obtidos para a umidade das amostras analisadas variaram entre $69,77 \pm 0,20$ e $71,92 \pm 0,20$ % (Tabela 19) e denotam que os produtos avaliados podem ser enquadrados como queijos com muita alta umidade, com teor superior a 55%, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996).

Oliveira et al. (2016) ao avaliaram queijos minas frescal produzidos com leite de cabra determinaram que os teores de umidade tiveram uma média de 62%, sendo também classificados como queijos com muita alta umidade. Obviamente a composição do leite, especialmente seu teor de proteínas e gordura interferem na retenção de água do queijo (Ricardo et al., 2011), outro fator que pode ter causado interferência foi a presença da matéria-prima sólida pinhão na composição do produto.

Os valores de proteínas obtidos ficaram entre $5,21 \pm 0,44$ e $6,67 \pm 0,39$ % nas amostras de queijos avaliadas (Tabela 18). Estes valores estão bem abaixo do mínimo preconizado pela legislação (BRASIL, 1996) que é de mínimo 88,0 (%m/m base seca).

O valor baixo de proteínas encontrado pode estar relacionado ao tratamento térmico utilizado, onde a temperatura não atingiu valores tão elevados. No entanto, as formulações foram desenvolvidas com adição de farinhas de pinhão cozido e pinhão cozido, na proporção de 10 – 20%, o que deveria elevar o valor de proteínas dos produtos finais tendo em vista que os valores de proteínas encontrados para as farinhas de pinhão cozido e pinhão cozido foram 7,15 e 5,92%, respectivamente.

A Instrução Normativa nº 4 categoriza o queijo Minas Frescal como semi-gordo, sua concentração deve se encontrar entre 25,0 e 44,9 % de gordura no extrato seco (BRASIL, 2004). As amostras analisadas (Tabela 19) encontram-se de acordo com o padrão de identidade para queijos Minas Frescal (BRASIL, 2004), embora o produto produzido tenha mais características de um queijo frescal

Tabela 18: Resultado médio dos teores de proteínas, umidade, extrato seco, lipídeos, cloretos, cinzas, fibras e carboidratos dos queijos, acrescidos de farinha de pinhão cozido ou pinhão cozido.

Análises	Amostras de Queijo			
	FPCZ 10%	FPCZ 20%	PCZ 10%	PCZ 20%
Proteínas	5,21 ± 0,44 A	5,32 ± 0,03 A	5,46 ± 0,78 A	6,67 ± 0,39 A
Umidade	70,01 ± 0,41 A	71,92 ± 0,20 A	69,77 ± 0,20 A	70,75 ± 1,33 A
Extrato Seco	29,99	28,08	30,15	29,25
Lipídeos	3,40 ± 0,00 A	5,35 ± 0,40 A	5,94 ± 0,42 A	6,48 ± 0,21 A
NaCl	1,20 ± 0,03 B	1,70 ± 0,04 A	1,75 ± 0,06 A	1,29 ± 0,12 B
RMF	2,01 ± 0,55 A	2,91 ± 0,75 A	1048 ± 0,14 A	2,05 ± 0,08 A
Fibra bruta	0,20 ± 0,03 B	0,27 ± 0,06 AB	0,36 ± 0,01 A	0,27 ± 0,03 AB
Carboidratos	17,97	12,55	14,76	12,45

RMF= Resíduo mineral fixo

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente. Pelo teste de Tukey, médias com a mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Queijo acrescido de farinha de pinhão cozido 10% (FPCZ 10), Queijo acrescido de farinha pinhão cozido 20% (FPCZ 20), Queijo acrescido de pinhão cozido 10% (PCZ 10), Queijo acrescido de farinha de pinhão 20% (PCZ 20).

Tabela 19: Resultado da avaliação microbiológica dos queijos acrescidos de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido.

Amostra	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	<i>Salmonella spp.</i>	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>	Bolores e Leveduras
	Média	Média	Média	Média	Média
FPCZ 10%	$<1,0 \times 10^2$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^3$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^0$ UFC/mL
FPCZ 20%	$<1,0 \times 10^2$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^3$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^0$ UFC/mL
PCZ 10%	$<1,0 \times 10^2$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^3$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^0$ UFC/mL
PCZ 20%	$<1,0 \times 10^2$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^3$ UFC/g	Ausência	$<1,0 \times 10^0$ UFC/mL

Fonte: Autoria própria (2019). Queijo acrescido de farinha de pinhão cozido 10% (FPCZ 10), Queijo acrescido de farinha pinhão cozido 20% (FPCZ 20), Queijo acrescido de pinhão cozido 10% (PCZ 10), Queijo acrescido de farinha de pinhão 20% (PCZ 20).

cremoso. Valores semelhantes foram encontrados por Ricardo et al. (2011) ao avaliarem queijos artesanais vendidos na região de Londrina (PR).

De acordo com Perry (2004), os queijos devem conter entre 0,5 - 2,0 % de NaCl. Durante o procedimento de salga do queijo, parte da umidade é liberada devido à diferença na pressão osmótica entre a salmoura e a massa, arrastando consigo soroproteínas, ácido láctico e minerais dissolvidos. Simultaneamente, ocorre a absorção do cloreto de sódio (NaCl) pelo queijo. Para que este equilíbrio funcione bem é necessário que a concentração da salmoura, o pH e o teor de cálcio estejam dentro dos limites apropriados.

Considerando os resultados encontrados (Tabela 18), verifica-se que a porcentagem de cloreto de sódio presente nas amostras de queijo acrescidas de farinha de pinhão cozido e pinhão cozido estavam dentro do limite estabelecido por Perry (2004), e em conformidade com os resultados encontrados por Hahn et al. (2016) para amostras de queijo de uma agroindústria de laticínios do município de Santo Ângelo (RS).

Os valores encontrados para lipídios nas quatro formulações desenvolvidas ficaram entre $3,40 \pm 0,00$ e $6,48 \pm 0,21$ % valores bem abaixo dos descritos por Vargas et al. (2012) que encontrou valores de 13,26 % de lipídios ao analisarem queijos do tipo mussarela.

Os valores de lipídios encontrados para todos os queijos desenvolvidos com adição de pinhão cozido e farinha de pinhão cozido, os classificam como queijos desnatados, pois apresentam valores de gordura abaixo de 10,0% de acordo com a Portaria Nº 146 de 1996 do MAPA (BRASIL, 1996).

O resultado da análise para fibra alimentar apresentou valores baixos, mas ainda acima do esperado para queijos, uma vez que não se espera a presença deste composto em queijos. Porém as porcentagens encontradas são aceitáveis pelo fato de os produtos desenvolvidos terem sido preparados com adição de pinhão cozido e sua farinha embora não haja um padrão para esse tipo de produto. Os valores encontrados para fibra (Tabela 18) nas 4 diferentes amostras de queijo fresco cremoso acrescidos de pinhão estão abaixo dos valores descritos por Nicoletti et al. (2016), que encontrou valores para fibra de 5,31% ao avaliar queijos do tipo cottage.

A determinação de carboidratos foi realizada pela diferença descontando de 100 o valor de umidade, proteínas, extrato seco, cloretos, cinzas e fibra. Os valores encontrados estão em desacordo com os resultados encontrados por Figueiredo et al. (2011) que foi de 2,20 e 2,12% para análise de queijos do Marajó tipo creme e os

valores descritos por Carara & Fontana (2015), 0,58 e 0,77% ao avaliaram queijos do tipo gorgonzola. Os valores altos de carboidratos encontrados estão relacionados à utilização de pinhão cozido e sua respectiva farinha na fabricação dos queijos.

Para a avaliação da qualidade microbiológica dos queijos analisados neste estudo, os resultados foram comparados com os padrões microbiológicos determinados para queijos na RDC nº 12 (2001) conforme descrito na introdução, que estabelece como grupos de micro-organismos indicadores de qualidade os coliformes a 45°C e os estafilococos produtores de coagulase. Sabe-se que esse grupo de micro-organismos geralmente é contaminante ambiental e sua contagem elevada indica deficiência na qualidade higiênico sanitária do produto (Brant et al., 2007).

Na Tabela 18 estão descritos os resultados da avaliação microbiológica dos queijos acrescidos de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido.

A contagem de coliformes a 35°C não é exigida pela legislação sanitária vigente, entretanto, como esses micro-organismos geralmente são contaminantes ambientais, sua contagem elevada indica deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto. Das quatro amostras avaliadas todas apresentaram formação de bolhas nos tubos na avaliação da presença de Coliformes totais indicando deficiência na qualidade higiênico sanitária dos produtos. No entanto, quando foi realizada a avaliação da presença de coliformes a 45°C não houve crescimento nas quatro amostras avaliadas, demonstrando que os produtos encontravam-se apropriados para consumo. Valores bem divergentes dos descritos por Passos et al. (2009), onde foram encontrados valores superiores a 500 UFC/g para *E. coli* e contagens maiores que 10^3 UFC/g para coliformes a 35°C ao avaliarem queijos minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR.

A presença de bolores e leveduras é um parâmetro de avaliação microbiológico que também não é exigido pela legislação sanitária vigente para queijos. Sua análise foi realizada para garantir uma melhor qualidade dos produtos. Os resultados encontrados estavam satisfatórios não apresentando contaminações significativas, estando abaixo do valor mínimo preconizado na legislação para outros alimentos cremosos como purês e doces em pasta, que é de no mínimo $<1,0 \times 10^4$ UFC/g. Já Nascimento e colaboradores (2018), observaram valores de bolores e leveduras variando de $3,5 \times 10^2$ a $3,1 \times 10^5$ UFC/g. Esses números elevados sugerem que os queijos analisados foram processados e/ou armazenados sob condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias, comprometendo a qualidade e a vida de

prateleira do produto, uma vez que bolores e leveduras são potenciais deterioradores de alimentos, principalmente de produtos lácteos.

Para os padrões microbiológicos de *Staphylococcus* coagulase positiva utilizou-se o limite determinado pela legislação. Das amostras avaliadas todas estavam dentro dos padrões microbiológicos determinados pela legislação vigente (BRASIL, 2001), para queijos cremosos e de alta umidade. Estudo realizado por Amorim et al. (2014), demonstraram 57,14 % das amostras de queijos industriais, 100 % das informais e 100 % das artesanais estavam em desacordo quanto às contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, quando avaliaram a qualidade microbiológica destes diferentes tipos de queijos Minas padrão de produção.

Nenhuma das amostras apresentou contaminação por *Salmonella spp.* em 25g em todas as amostras de queijo avaliadas. Mesmos resultados encontrados por Apolinário et al. (2014), ao avaliarem a qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais.

A análise sensorial ocorreu por teste de ordenação de preferência, com participação de 35 julgadores não treinados, sendo os resultados apresentados na tabela 20. A ordenação foi feita atribuindo o nº 1 para a amostra de maior preferência, 2 para a segunda de maior preferência, e assim sucessivamente. Após se realizou a soma das ordens para cada amostra, obtendo-se a média geral de cada formulação.

Na impressão global, as formulações de queijos apresentaram escores médios na casa dos 2, situando-se como um produto com boa preferência e aceitação. A formulação de queijo com adição de farinha de pinhão cozido 20% apresentou o melhor resultado com média de 2,60 %, no entanto ao se avaliar a média geral de todos os queijos, é possível verificar que não existe diferença estatística significativa entre as quatro diferentes formulações, o que ficou comprovado pela análise de variância que demonstrou que não existe diferença significativa a 5% de significância ($p > 0,05$) no teste de Tukey.

Todas as amostras avaliadas haviam sido congeladas antes da realização da análise sensorial. Pode-se observar pelos resultados das médias obtidas que não houve diferença significativa entre os quatro queijos avaliados, pois a preferência dos provadores foi praticamente equitativa para todas as amostras avaliadas (Tabela 20).

Tabela 20: Média das notas da análise sensorial dos queijos.

Médias	Produto equivalente
2,57 A	Queijo com adição de pinhão cozido 20%
2,48 A	Queijo com adição de farinha de pinhão cozido 10%
2,60 A	Queijo com adição de farinha pinhão cozido 20%
2,11 A	Queijo com adição de pinhão cozido 10%

Fonte: Autoria própria (2019).

Média dos valores obtidos experimentalmente. Pela ANOVA ($p>0,05$) não apresentaram diferença significativa.

Após a avaliação dos resultados da análise sensorial com as quatro diferentes formulações de queijo, foi realizada uma análise pareada de preferência, com a amostra de queijo 4 desenvolvido com 10% de pinhão cozido, para verificar a aceitação entre amostras congeladas e amostras resfriadas.

Nesta segunda avaliação foram recrutados 50 provadores não treinados, de ambos os sexos com idades entre 18 e 60 anos, entre alunos, professores e demais funcionários da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Cascavel, PR. As amostras do queijo com adição de 10% de pinhão foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e apresentadas aos julgadores que deveriam apontar qual das duas lhes agradava mais em relação ao sabor e textura. Foi utilizado para a realização deste teste o queijo fabricado com 10% de pinhão por ter sido o último a ser produzido, desta forma foi possível trabalhar com amostras apenas resfriadas e amostras congeladas, verificando assim a existência de diferença no sabor, aroma e consistência do produto quando armazenada por estes dois diferentes processos de conservação. O queijo foi servido na quantidade de aproximadamente 5 g de cada amostra. Os resultados estão expressos na Tabela 21.

Tabela 21: Porcentagem de preferência da análise sensorial de queijo acrescido com 10% de pinhão cozido.

Amostras	Médias	Produto equivalente
673	64%	Queijo acrescido com pinhão cozido 10% congelado
028	32%	Queijo acrescido com pinhão cozido 10% refrigerado

Fonte: Autoria própria (2019).

O resultado demonstrou que 64% dos provadores preferiram o produto congelado para consumo. Utilizando o teste de afetividade preferencial pareado, foi possível verificar que houve influência do congelamento no sabor e textura do

queijo, sendo que este foi o mais preferido pela maioria dos consumidores. Sendo neste caso favorável à produção em larga escala de um queijo frescal cremoso acrescido de pinhão cozido. Um produto novo com característica de inovador por conter em sua composição a adição de pinhão cozido, além de sabor, coloração e texturas próprios.

4 Conclusão

A avaliação dos queijos demonstrou que no geral todas as amostras atendem aos critérios estabelecidos pela legislação para a fabricação de queijos tipo minas frescal. Em alguns aspectos, as exigências da lei ficaram fora do preconizado, como proteínas e carboidratos, fato que pode ter ocorrido devido ao processo de fabricação utilizado e ao acréscimo de pinhão na fabricação dos queijos. Vale ressaltar que não existem em literatura oficial ou legislação padrões para comparação.

No quesito microbiológico os quatro queijos produzidos estavam em consonância com o que se espera para este tipo de produto. Mesmo que as quatro diferentes formulações tenham apresentado uma quantidade alta de umidade, todos os parâmetros microbiológicos avaliados estavam dentro do especificado em legislação.

A avaliação sensorial demonstrou que os queijos produzidos com adição de pinhão cozido ou farinha de pinhão cozido em sua composição apresentaram boa aceitação pelos consumidores, sendo fortes candidatos a um produto inovador para ser produzido e comercializado em grande escala. Além disso, o desenvolvimento deste produto abre caminho para o estudo e produção de outros trabalhos nos quais se avaliaria outros produtos lácteos como queijos maturados, fundidos como requeijão e inúmeras outras possibilidades.

5 Referências bibliográficas

1. Amorim, A.L.B.C., Couto, E.P., Santana, A.P., Ribeiro, J.L., Fereira, M.A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, SP, 2014.
2. Apolinário, T.C.C., Santos, G.S., Lavorato, J.A.A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, novembro/dezembro, Juiz de Fora, MG, 2014.
3. Brant, L.M.F.; Fonseca, L.M.; Silva, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574. Belo Horizonte, MG, 2007.
4. BRASIL. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de março de 1996.
5. BRASIL. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Ministério da Agricultura. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de setembro de 1997.
6. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC Nº 12, de 02 De Janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 de janeiro de 2001.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 04, de 01 de março de 2004. Regulamente o padrão de identidade e qualidade de queijo minas frescal no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 de março de 2004.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializar os Métodos Analíticos

Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de outubro de 2006.

9. Carara, L.C. & Fontana, S. Valor calórico e determinação de natamicina em queijos tipo gorgonzola. **Dissertação de Graduação** – curso de Tecnologia em Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Francisco Beltrão, PR.

10. Castanheira, A.C.G. **Manual básico de controle da qualidade de leite e derivados - comentado**. 1 ed., cap. 4, p. 99-100. Cap-Lab, São Paulo, SP, 2010.

11. Fariña, L.O., Kurumiya, R., Takano, D., Mousquer, E.C., Falconi, F.A., Bueno, F.G., Ferreira, R., Paez, C.M.P., Tavares, B., Dallabrida, S.F. Análise de composição e avaliação da acidez do Queijo Colonial produzido por agricultores familiares de Céu Azul (PR). **COSIMP** - Anais do 3º Congresso de Ciências Farmacêuticas e 3º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do MERCOSUL. Cascavel, PR, 2008.

12. Hahn, C.L., Barth, I.R., Casarin, V.A., Miranda, R.L., Ortiz, L.C.V., Santos, A.V. Determinação do cloreto de sódio em uma amostra de queijo de uma agroindústria de laticínios do município de Santo Ângelo. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; XCIGR Section International Technical Symposium**. 24 a 27 de outubro, FAURGS – Gramado, RS, 2016.

13. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. V. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. IMESP, 1985. São Paulo, SP, 2008.

14. Nascimento, J.L.D, Coelho, M.C.S.C., Coelho, M.I.S., Libório, R.C., Costa, F.F.P., Sá, D.R.C. Contagem de bolores e leveduras e análise da presença de amido em queijos de manteiga comercializados em feiras livres do município de Petrolina – PE. **6º simpósio de segurança alimentar – Desvendando mitos**. 15 a 18 de maio, FAURGS – Gramado, RS, 2018.

15. Nicoletti, G., Verdi, K.J., Endres, C.M. desenvolvimento de queijo tipo cottage sem lactose com adição de fibras e redução de sódio e gordura. **Revista do**

Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, v. 71, n. 4, p. 186-196, out/dez, 2016.

16.Oliveira, K.A.M., Jardim, D.M., Chaves, K.S., Oliveira, G.V., Vidigal, M.C.T.R. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de queijo minas frescal de leite de cabra desenvolvido por acidificação direta e fermentação láctica. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. V. 71, n. 3, p. 166-178, julho/setembro, Juiz de Fora, MG, 2016.

17.Passos, A.D., Ferreira, G.K.L., Juliani, G.L., Santana, E.H.W., Aragon-Alegro, L.C. Avaliação microbiológica de queijos minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Julho / Agosto, nº 369, 64: 48-54, Juiz de Fora, MG, 2009.

18.Paula, J.C.J., Carvalho, A.F., Furtado, M.M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico a salga. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Março/Junho, nº 367/368, 64: 19-25, Juiz de Fora, MG, 2009

19.Ricardo, N.R., Katsuda, M.S., Maia, L.F., Abrantes, L.F., Oshiro, L.M. Análise físico-química de queijos minas frescal artesanais e industrializados comercializados em Londrina-PR. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**. V.2, n.2, p.89-95, Julho/Dezembro, Campo Mourão, PR, 2011.

20.Rizzini, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil – Manual de Dendrologia Brasileira**. Editora Edgard Blucher Ltda, p.30 – 34, São Paulo, SP, 1986.

21.Sandri, D.O., Silva, F.S., Porto, A.G., Derlan, J.M., Testa, P.A., Campos, K.C.G., Viana, D.C. Análise físico-química do queijo minas frescal produzido no estado de Mato Grosso. **Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de alimentos**. Vol. 2, Campinas, SP, 2015.

22.Schuh, J., Mattiel. C.A., Neto, A.T., Milezzi, A.F., Ferenz, M., Ribeiros, M., Silveira, S.M. avaliação dos parâmetros de ph e umidade e contaminação de queijo colonial por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; XCIGR Section International Technical Symposium. 24 a 27 de outubro, FAURG, Gramado, RS, 2016.

23.Tiba, D.S. & Ribeiro, E.P. Avaliação das características físico-químicas de queijo minas frescal, produzido a partir de retentados obtidos por ultrafiltração de leite, enriquecido em fibras, minerais e vitaminas, destinado a idosos. **Instituto Mauá de Tecnologia**. São Caetano do Sul, SP, 2010.

24.Vargas, A.G., Loregian, A., Silva, E.S., Carpes, S.T. Análise bromatológica de Queijo tipo Mussarela. **XIX Encontro de Química da Região Sul**. 7 a 9 de novembro, Tubarão, SC 2012.

Capítulo 4. Artigo: Desenvolvimento de Extratos da Casca do Pinhão (*Araucaria angustifolia*) e Avaliação da sua Atividade Antimicrobiana

Resumo – O uso de plantas medicinais e da fitoterapia tradicional tem sido uma alternativa bastante utilizada e reconhecida para tratamento de diversas enfermidades, tendo como foco as comunidades rurais e populações carentes. Esta prática tem ganhado cada vez mais espaço, além disso, existem inúmeras plantas que ainda não possuem sua ação farmacológica estudada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de casca de pinhão (semente da *Araucaria angustifolia*) na forma *in natura* e que passaram por processo de cozimento, sendo dois extratos hidroalcoólicos e dois extratos aquosos. Após obtenção dos extratos estes foram liofilizados para maior padronização e estabilidade no armazenamento. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada por teste de halo de inibição contra as espécies de bactérias patógenas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e bactérias Gram-negativas (*E.coli* ATCC 25922) e fungo (*Candida parapsilosis* isolado de uma Urocultura no Hospital Universitário do Oeste do Paraná). Os quatro extratos foram testados na concentração de 10% e somente os extratos aquosos apresentaram atividade inibitória intermediária para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, porém não apresentaram efeito sobre *Escherichia coli* e *Candida parapsilosis*. Novos estudos devem ser realizados buscando maximizar a eficácia destes extratos, avaliando maiores concentrações e, posteriormente, aplicá-los em testes *in vivo*.

Palavras-chave: Aplicação, biodiversidade, inibição, micro-organismos.

1. Introdução

A prática da fitoterapia como alternativa na medicina popular foi bastante utilizada e valorizada principalmente nas comunidades rurais e populações carentes, resultado da experiência acumulada durante séculos pelo uso e cultivo dessas plantas medicinais (Alves et al., 2015). Entre as diversas tecnologias desenvolvidas, o uso de produtos fitoterápicos é que se encontra em fase mais avançada de pesquisa e demonstrando resultados promissores (Sprenger et al., 2015).

O uso de plantas medicinais na forma de tinturas é um dos meios mais difundidos de utilização. De acordo com Brasil (2011), tintura é a preparação alcoólica ou hidroalcoólica resultante da extração de drogas vegetais ou animais ou

da diluição dos respectivos extratos. É classificada em simples e composta, conforme preparada com uma ou mais matérias-primas. A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, 10 mL de tintura simples correspondem a 1 g de droga seca.

Os extratos aquosos são mais raramente utilizados, pois usam apenas a água como líquido extrator, ocorrendo sempre sob temperatura elevada e em constante agitação durante o processo de extração (Fonseca, 2005).

Apesar da importância, essa prática vem sendo ameaçada por diversos fatores como a facilidade de acesso à medicina moderna e a saída das pessoas de seus ambientes naturais para regiões urbanas, levando-se assim a perda do conhecimento popular herdado e transferido há várias gerações (Alves et al., 2015).

Popularmente, diversas partes de *Araucaria angustifolia* como as folhas, o nó-de-pinho e a casca do caule têm sido utilizadas na medicina popular como antisséptico e para o tratamento de diversas doenças, como infecções respiratórias, reumatismo, controle da pirose e no tratamento da anemia (Souza, 2013).

Estas atividades farmacológicas, que são atribuídas a diferentes partes da Araucária, estão relacionadas a diversos compostos fitoquímicos presentes na planta. Na semente, compostos fenólicos podem migrar do revestimento interno para a polpa durante o processo de aquecimento e, portanto, quantidades significativas de catequina e quercetina podem ser encontradas na semente cozida (Cordenunsi et al. 2004; Koehnlein et al., 2012). Estudos demonstram que as brácteas (sementes estéreis) contêm níveis elevados de compostos químicos, como 3-glucosidedihidroquercetina, Amentoflavone 4', 4'', 7,7''-tetrametil, Apigenina, Catequina, Epicatequina, Éter, Quercetina e Rutina, com importantes ações farmacológicas (Branco et al., 2016). A casca da árvore apresenta alta concentração de flavonóides e atividade antioxidante. Além disso, as folhas dessa árvore contêm proantocianidinas e biflavonóides e apresentaram atividade anti-herpes (Sousa, 2013). Os flavonóides mais comuns encontrados na Araucária são catequina e epicatequina que são flavan-3-ols (derivados de flavanos que usam a estrutura 2-fenil-3,4-diidro-2H-cromen-3-ol), a subclasse mais complexa de flavonóides.

A casca do pinhão cozido ou cru é geralmente descartada no ambiente. Estima-se que aproximadamente 10 toneladas de cascas de pinhão são descartadas anualmente. Como estas cascas levam muito tempo para se decompor, várias investigações procuram por possíveis utilizações (Freitas et al., 2018; Peralta et al., 2016).

Alguns estudos argumentam que a casca do pinhão pode ser uma ferramenta poderosa e barata para remover metais pesados e corantes no tratamento de efluentes de curtume e metalúrgicos industriais. (Peralta et al., 2016).

Para se obter um produto com maior estabilidade, os extratos passam por um processo de liofilização que, de acordo com Chaicouski et al. (2014), consiste em um processo de desidratação caracterizado pela separação por sublimação, onde a água é retirada na forma de vapor a baixa temperatura do material previamente congelado, passando de sólido direto para vapor, sendo que a posterior reidratação dos produtos é quase perfeita. Este processo preserva melhor a qualidade do produto aumentando a estabilidade do mesmo durante a estocagem, além de o material poder ser armazenado e transportado à temperatura ambiente (Fonseca, 2005).

Com a eliminação da água, algumas enzimas são paralisadas e as reações químicas ocorrem em baixa velocidade, sendo um bom resultado para a estabilidade do material obtido. Uma questão importante é a maneira como embalar o produto, que deve ser sem umidade, em alguns casos utiliza-se atmosfera modificada, para que o produto possa ser armazenado sem perder suas propriedades, podendo ser reconstituído a qualquer momento (Chaicouski, 2014). Levando em consideração que um grande volume de cascas é produzido e descartado como resíduo, quando do consumo deste alimento, o presente trabalho se propõe ao desenvolvimento de extratos hidroalcoólicos e aquoso a partir da casca do pinhão (fruto), para avaliação da atividade antimicrobiana destes extratos sob diferentes micro-organismos.

2. Metodologia

Foram utilizadas cascas de pinhão que passaram pelo processo de cozimento e cascas de pinhão que não passaram por este procedimento. As cascas foram secas em estufa de convecção simples com calor controlado entre $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas, sendo posteriormente trituradas em liquidificador doméstico para obtenção de matéria-prima com menor diâmetro, facilitando assim o processo de extração dos princípios ativos presentes. Após a trituração, as cascas foram acondicionadas em embalagens plásticas até o momento de sua utilização para evitar a umidificação da mesma.

2.1. Preparo da solução hidroalcoólica 70%

Primeiramente foi preparada uma solução hidroalcoólica a partir da mistura de água deionizada e álcool de cereais e padronizada para 70°GL (tolerância de 68% v/v a 72% v/v), com auxílio de alcoômetro, termômetro e a Tábua da Força Real dos Líquidos Espirituosos (Anexo 4) (BRASIL, 2012; Laboratório... 2017).

2.2. Preparo dos extratos

As tinturas foram preparadas numa concentração de 20%, ou seja, 20 g da matéria-prima vegetal rendem 100 ml de tintura e assim sucessivamente. Os extratos hidroalcoólicos foram preparados pelo método de maceração, em ambiente fechado, preferencialmente âmbar, em temperatura ambiente (média de 18°C), sem remoção do líquido extrator e sob agitação ocasional por um período de, no mínimo, sete dias, conforme orientação do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira 1º edição (BRASIL, 2011).

Após a pesagem, a matéria-prima vegetal foi umedecida com uma pequena quantidade de solução hidroalcoólica de forma homogênea, sem a formação de aglomerados, e deixada em repouso por 30 minutos. Em seguida, acondicionou-se a matéria-prima vegetal umedecida em recipiente, onde foi realizado o processo de extração, adicionando-se a quantidade de solvente específica para a quantidade da matéria-prima utilizada. Foram preparados dois diferentes extratos: um com casca de pinhão que passou por processo de cozimento e outro com casca de pinhão *in natura*.

O processo de maceração durou 7 dias, de acordo com o recomendado pelo método da Farmacopéia Brasileira (1988), ocorrendo agitação manual do recipiente contendo a mistura por, pelo menos, duas vezes ao dia. Decorrido este período, o extrato obtido foi filtrado, encontrando-se pronto para uso ou análise, obtendo-se assim o extrato hidroalcoólico de casca de semente de pinhão (um com casca de pinhão cozido e outro com casca de pinhão *in natura*). Antes da liofilização o etanol foi removido com auxílio de evaporador rotativo até 1/3 do volume original no laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Cascavel, PR, sendo na sequência levado para congelamento e posteriormente liofilização, obtendo-se assim um extrato seco liofilizado de casca de semente de pinhão.

O extrato aquoso foi preparado também em concentração de 20%, misturando-se a quantidade material vegetal em água destilada e mantido por um período de 60 minutos em agitação a uma temperatura de 70°C. Para completa

incorporação da matéria-prima, é importante nesta fase do processo não deixar a mistura de planta e água ferver, para que a extração saia mais homogênea e não ocorra degradação dos princípios ativos. A mistura obtida foi então filtrada em algodão para obtenção da primeira fração do extrato e resíduo. O resíduo recebeu o mesmo tratamento anterior, obtendo-se assim a segunda fração do extrato. As duas frações do extrato foram então misturadas e levadas para congelamento, sendo na sequência liofilizados, obtendo-se assim um extrato seco liofilizado de casca da semente do pinhão.

2.3. Microorganismos Testados

O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário da UNIOESTE - HUOP, campus Cascavel, PR. Foram utilizadas as cepas de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* ATCC25922 e fungo *Candida parapsilosis* isolado de uma Urocultura, adquiridos na instituição.

2.4. Preparo dos inóculos

Para o preparo das cepas padrão, foram seguidas as metodologias descritas por cada fabricante e seguindo as recomendações no manual da ANVISA - Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (2006).

Para a padronização da técnica e dimensionamento do inóculo, quatro colônias com a mesma morfologia de cada cepa bacteriana foram misturadas em 4 mL de água para injetáveis (q.s.p 1 mL; pH 6 ± 1) e comparadas ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/ml).

2.5. Ensaios de Antibiose

O *screening* foi realizado em placa com meio Muller Hilton Agar solidificado, contendo orifícios de 5 mm de diâmetro, no qual se realizou a semeadura em superfície dos inóculos através de swab (Figura 17). Após a semeadura dos microorganismos, foram adicionados em cada orifício 100µl dos extratos na concentração de 10% diluídos em água estéril e incubados a 35 – 37° C por 24 horas. Foi mantida uma distância média de 40 mm entre os orifícios para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição. Em um dos orifícios foram colocados 100 µl de água

estéril para verificar possível efeito inibidor ou interferente do solvente utilizado para o preparo da diluição frente aos micro-organismos testados. Em seguida, as placas foram fechadas sendo as mesmas incubadas sem inversão. Após 24h de incubação, foi realizada a leitura dos resultados, nos quais se observou o diâmetro dos halos de inibição formados por cada extrato (Machado, 2006; Farmacopéia Brasileira, 1988). Os ensaios foram realizados em duplicata.

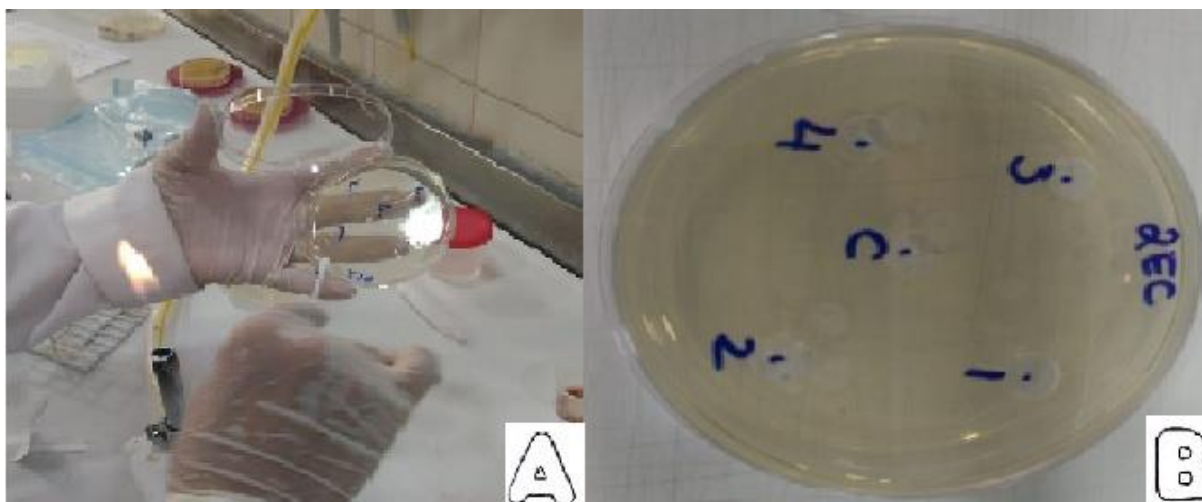


Figura 17: Imagem A: Semeadura dos micro-organismos nas placas. Imagem B: Placa com meio Muller Hilton Agar solidificado, contendo orifícios de 5 mm de diâmetro.

Fonte: Autoria própria (2019).

Para a interpretação dos dados foram seguidas as recomendações *do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, onde os halos de inibição formados foram comparados com a tabela de referência, sendo os micro-organismos classificados como resistente (zona de inibição inferior a 15 mm), intermediário (de 15 – 29 mm) e sensível (de 30 – 35 mm) a determinado agente (NCCLS, 2000). O halo de inibição foi considerado como a área sem crescimento detectável a olho nu.

3. Resultados e discussão

Os resultados das médias dos halos de inibição (mm) do potencial antimicrobiano dos extratos hidroalcoólicos e aquosos da casca da semente da *Araucaria angustifolia* contra *Candida parapsilosis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 22: Atividade antimicrobiana dos extratos de casca de pinhão.

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.parapsilosis</i>
EACPC	17 ^I cm	SI	SI
EACPCZ	17 ^I cm	SI	SI
EHPCPC	14 ^R cm	SI	SI
EHPCPCZ	13 ^R cm	SI	SI

Fonte: Autoria própria (2019).

EACPC = Extrato Aquoso de Casca de Pinhão Cru; EACPCZ = Extrato Aquoso de Casca de Pinhão Cozido; EHPCPC = Extrato Hidroalcoólico da Casca do Pinhão Cru; EHPCPCZ = Extrato Hidroalcoólico de Casca de Pinhão Cozido.

^RResistente = halo de inibição inferior a 15 mm; ^IIntermediário = halo de inibição de 15 a 29mm; ^SSensível = halo de inibição de 30 a 35 mm. Os espaços em branco (-) indicam ausência de halo de inibição. SI-Ausência de halo de inibição.

A partir da análise dos dados obtidos, levando-se em conta as médias dos halos de inibição, verificou-se que apenas os extratos aquosos apresentaram efeito contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (Figura 18) e ausência de efeito contra os demais micro-organismos testados. No entanto, o efeito inibitório ficou classificado como intermediário apenas para os extratos aquosos, demonstrando assim que este método de extração apresenta melhor eficácia frente à matéria-prima utilizada e que o tratamento térmico não interfere na atividade antimicrobiana.

Já os extratos hidroalcoólicos não apresentaram nenhum efeito satisfatório diante dos micro-organismos testados. Da mesma forma, Lauer et al. (2018) não detectaram efeito inibitório do crescimento de fungos do gênero *Candida albicans* frente a extratos vegetais de *Equisetum hyemale* L., *Leonurus sibiricus* L. e *Morus nigra*, assim como Klein e colaboradores (2015), que não encontraram ação antifúngica do extrato aquoso da casca do pinhão frente a diferentes fungos avaliados, situação que foi relacionada ao fato de alguns fungos como o *Aspergillus Níger* e *Penicillium spp.* podem crescer na presença de taninos e seus monômeros e dímeros, tendo a utilização destes compostos como uma fonte de carbono (Scalbert, 1991).

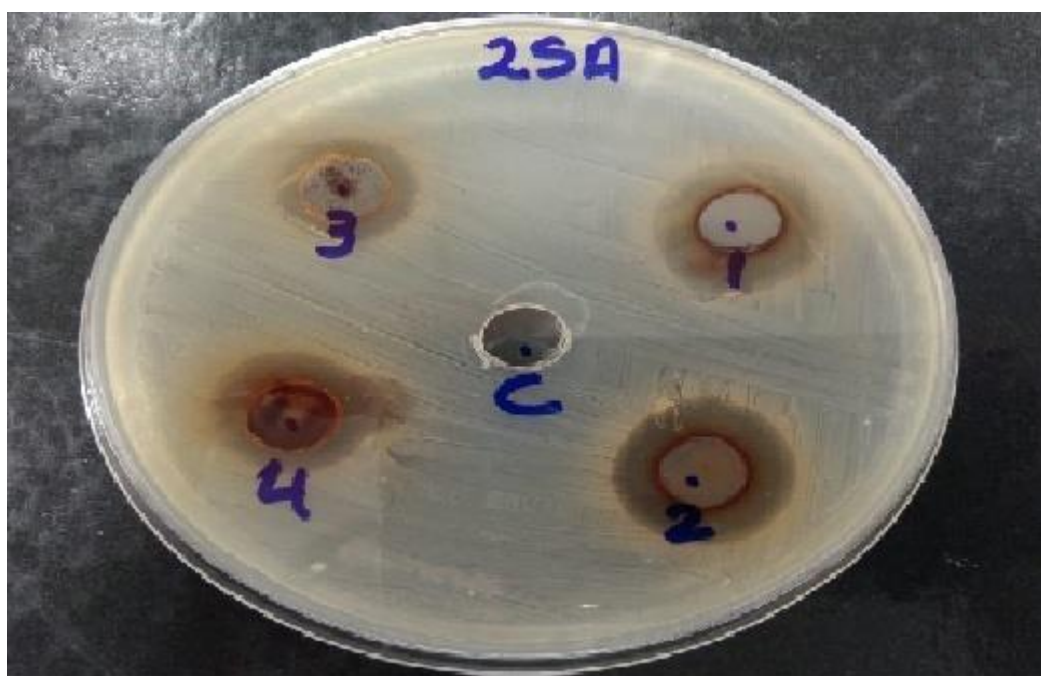


Figura 18: Placas apresentando halos de inibição frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Autoria própria (2019).

O extrato aquoso não apresentou capacidade de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa estudada (*E. coli*), mesmo resultado encontrado por Kleinet al. (2015). Estes resultados são divergentes ao encontrado por Lima et al. (2014), ao avaliarem resinas brutas da casca da Araucária, onde estas apresentaram efeito antimicrobiano a diversas bactérias Gram-negativas.

O ensaio de atividade antibacteriana mostrou que 100% (4/4) dos extratos apresentaram algum efeito inibitório contra a bactéria Gram-positiva testada. No entanto, os valores ficaram classificados entre ação intermediária e resistente, valores que não são fortes o suficiente para ter uma ação antibacteriana de uso medicinal, mas vale ressaltar que foi utilizada uma concentração de 10%, podendo ser realizados novos estudos com maiores concentrações e, consequentemente, melhores resultados.

Os extratos aquosos apresentaram um melhor resultado em comparação aos extratos hidroalcoólicos. Este melhor resultado pode estar relacionado ao fato de ocorrer uma melhor extração de compostos fitoquímicos pela água, como é o caso dos fenóis, flavonóides e taninos. Mesmo no extrato produzido com casca de pinhão que passou por processo de cozimento, o resultado foi melhor (halo de inibição de 17 cm) do que o obtido com os extratos extraídos com solução hidroalcoólica.

Como a casca do pinhão é rica em taninos, e estes são compostos fenólicos que apresentam solubilidade em água e ação bacteriana (Sonaglio, 2000), os

resultados obtidos com os extratos aquosos produzidos a partir desta matéria-prima apresentaram um melhor resultado em comparação com os extratos hidroalcoólicos, pela maior extração de princípios ativos pela água.

Os resultados do presente estudo indicam que a atividade antibacteriana observada pelas espécies avaliadas pode estar relacionada com classes de substâncias ativas, responsáveis pelo metabolismo secundário dos vegetais como lecitinas, proantocianidinas e taninos condensados (Franceschini Filho, 2004; Martins et al., 2000), e sugere-se que o estudo dos extratos possa ser considerado mais propício se estas forem submetidas a estudos fitoquímicos para isolamento, identificação de composto(s) ativo(s) presentes e determinação da concentração inibitória mínima.

4. Conclusão

A produção de extratos aquosos, obtidos de cascas de pinhão que passaram pelo processo de cozimento e que não passaram por este processo se mostrou de fácil realização, obtendo-se um extrato com características próprias e de fácil execução, e com isso resolvendo a questão da não utilização deste resíduo. Além disso, levando-se em consideração os resultados obtidos, ficou evidente que os extratos avaliados pela presente metodologia demonstram ser candidatos a descoberta de um novo medicamento com propriedade antimicrobiana, contra bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* e possivelmente outros gêneros de micro-organismos. Novos estudos devem ser realizados buscando maximizar a eficácia destes extratos, avaliando diferentes concentrações e, posteriormente, aplicá-los em testes *in vivo*.

5. Referências bibliográficas

1. Alves, J.J.P, Lima, C.C., Santos, D.B., Bezerra, P.D.F. Conhecimento popular sobre plantas medicinais e o cuidado da saúde primária: um estudo de caso da comunidade rural de Mendes, São José de Mipibu/RN. Carpe Diem: **Revista Cultural e Científica do UNIFACEX**, v. 13, n. 1, Natal, RN, 2015.
2. ANVISA - Manual de Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Termo de Cooperação 37 (TC 37) entre a **Agência Nacional de Vigilância** Sanitária / Ministério de Saúde e a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde - Representação do Brasil, Brasília, DF 2006.
3. Branco, C. S., Rodrigues, T.S., Lima, E. D., Calloni, C., Scola, C., Salvador, M. Chemical Constituents and Biological Activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **Journal of Organic & Inorganic Chemistry** ISSN 2472-1123. Vol. 2 No. 1: 1, 2016.
4. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos. Farmacopéia Brasileira. 1ª edição. P. 11 – 13. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2011.
5. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário nacional da farmacopéia brasileira. Ministério da Saúde. 2ª ed. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012.
6. Chaicouski, A., Silva, J.E., Trindade, J.L.F., Canteri, M.H.G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquidos e secos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.16, n.1, p.33-41, Compina Grande, PB, 2014.
7. Cordenunsi, B.R., Menezes, E.W., Genovese, M.I., Colli, C., Souza, A.G., Lajolo, F.M. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 52, 3412–3416, São Paulo, SP, 2004.
8. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA** 1988 4ª ed. Parte I. Ed. Atheneu: São Paulo/SP.

- 9.Fonsêca, S.G.C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Departamento de Farmácia – UFC. Fortaleza – CE, 2005.
- 10.Franceschini Filho, S. **Plantas Terapêuticas**. Organização Andrei Editora Ltda. São Paulo, SP, 2004.
- 11.Freitas, T.B., Santos, C.H.K., Silva, M.V., Shirai, M.A., Dias, M.I., Barros, L., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., Gonçalves, O.H., Leimann, F.V. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**. V. 15. Pag. 28–34, Freising, Alemanha, 2018.
- 12.Klein, M.I., Biondo, E., Kolchinski, E.M., Padilha, R.L., Brandelli, A., Sant’Anna, V. Avaliação da atividade antimicrobiana e alelopática de extrato de casca de pinhão. **5º Simpósio de Segurança Alimentar – Alimentação e Saúde**. 26 a 29 de maio. Bento Gonçalves, RS, 2015.
- 13.Koehnlein, E.A., Carvajal, A.E.S., Koehnlein, E.M., Moreira, J.S.C., Inácio, F.D., Castoldi, R., Adelar Bracht, A., Peralta, R.M. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**. Vol. 6 (21) pp. 512-518, 15, Maringá, PR, 2012.
- 14.Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa. **Saiba como preparar álcool desinfetante**. Documento on-line. Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa. Prado Velho – Curitiba, PR, 2017.
- 15.Lauer, A.; Santos, D.S.F.; Puerari, A.C.; Salvador, C.G. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais. **Revista Conexão Eletrônica**- Volume 15 – Número 1 – Três Lagoas, MS, 2018.
- 16.Lima, T.C.D., Oliveira, F.R., Lima, M.V.D., Monteiro, M.C., Torres, Y.R. Avaliação da atividade antibacteriana das resinas de *Araucaria angustifolia*. **Anais do III Congresso de Educação em Saúde da Amazônia (COESA)**, Universidade Federal do Pará, 12 a 14 de novembro. Belém, PA, 2014.

17. Machado, C. H. C.; Gioppo, N. M. R.; Marcondes, N. R. Avaliação da atividade antimicrobiana da Própolis sobre gêneros de microrganismos mais prevalentes em infecções humanas. In: **I Simpósio Médico**. Cascavel, PR, 2006.
18. Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E. **Plantas medicinais**. Ed. UFV, 4. ed. Viçosa, MG, 2000
19. NCCLS. National Committee of Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 2000.
20. Peralta, R.M., Koehnlein, E.A., Oliveira, R.F., Correa, V.G., Corrêa, R.C.G., Bertonha, L., Bracht, A., Ferreira, I.C.F.R. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**. V. 54. Pag. 85 a 93, Norwich, Reino Unido, 2016.
21. Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochem**. V. 30, p. 3875 – 3883, Nantes, França, 1991.
22. Sonaglio, D., Ortega, G.G., Petrovick, P.R., Bassani, V.L.: Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Capítulo 13. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da URGs/UFSC, p. 223-259, 2000.
23. Souza, M.D.O. Caracterização química, atividade antioxidante e antígeno tóxica de extrato de brácteas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Dissertação de Mestrado**, programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2013.
24. Sprenger, L.K., Buzatti, A., Campestrini, L.H., Yamassaki, F.T., Maurer, J.B.B., Baggio, S.F.Z., Magalhães, P.M., Molento, M.B. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de

bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.67, n.1, p.25-31, Curitiba, PR, 2015.

Anexos

Anexo 01

Teste de escala hedônica	
Nome: _____ Data: _____	
Instruções	
Deguste cuidadosamente cada uma das amostras e utilize a escala abaixo para expressar o quanto você gostou ou desgostou do produto.	
1- Desgostei muitíssimo;	
2- Desgostei muito;	
3- Desgostei regularmente;	
4- Desgostei ligeiramente;	
5- Indiferente;	
6- Gostei ligeiramente;	
7 - Gostei regularmente;	
8- Gostei muito;	
9- Gostei muitíssimo;	
Código da amostra	Valor atribuído
Sugestões:	

Figura 22: Ficha de avaliação sensorial de aceitação de produto.

Anexo 02

Teste de Atribuição de Preferência	
Nome: _____ Data: _____	
Instruções	
Você está recebendo amostras de queijo de pinhão. Por favor, prove as amostras fornecidas da esquerda para a direita.	
Atribua o nº 1 para a mostra de maior preferência, 2 para a segunda de maior preferência, e assim sucessivamente.	
Entre as amostras enxágue a boca com água e espere 30 segundos.	
Código da amostra	Ordem de preferência
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Comentários:	

Figura 23: Ficha de avaliação sensorial de queijos acrescidos de pinhão e de farinha de pinhão.

Anexo 03

Teste de Comparação Pareada	
Nome: _____ Data: _____	
Produto: Queijos com adição de pinhão	
Por favor, avalie as amostras da esquerda para a direita, coloque os códigos e assinale a amostra de sua preferência.	
Amostra	Assinale a amostra preferida
_____	()
_____	()
Comentários: _____	

Figura 24: Ficha para avaliação por comparação pareada de amostras de queijos cremosos acrescidos de pinhão.

Anexo 04

TÁBUA DA FORÇA REAL DOS LÍQUIDOS ESPIRITUOSOS
INDICAÇÃO DO ALCOÔMETRO (força aparente)

Temp. °C	56c	57c	58c	59c	60c	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c	69c	70c
30°	50,6	51,6	52,6	53,6	54,7	55,7	56,7	57,8	58,8	59,9	60,9	61,9	63,0	64,0	65,0
29°	51,0	52,0	53,0	54,0	55,0	56,0	57,1	58,1	59,2	60,2	61,2	62,3	63,3	64,3	65,4
28°	51,3	52,3	53,3	54,4	55,4	56,4	57,5	58,5	59,5	60,6	61,6	62,6	63,7	64,7	65,7
27°	51,7	52,7	53,7	54,8	55,8	56,8	57,8	58,9	59,9	60,9	61,9	63,0	64,0	65,0	66,0
26°	52,0	53,0	54,0	55,1	56,1	57,1	58,1	59,2	60,2	61,3	62,3	63,3	64,3	65,3	66,4
25°	52,4	53,4	54,4	55,5	56,5	57,5	58,5	59,5	60,6	61,6	62,6	63,7	64,7	65,7	66,7
24°	52,8	53,8	54,8	55,8	56,8	57,8	58,9	59,9	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,1
23°	53,1	54,1	55,1	56,1	57,1	58,1	59,2	60,2	61,3	62,3	63,3	64,3	65,4	66,4	67,4
22°	53,5	54,5	55,5	56,5	57,5	58,5	59,5	60,6	61,6	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,8
21°	53,9	54,9	55,9	56,9	57,9	58,9	59,9	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,1
20°	54,2	55,2	56,2	57,2	58,2	59,2	60,3	61,3	62,3	63,3	64,3	65,4	66,4	67,4	68,4
19°	54,6	55,6	56,6	57,6	58,6	59,6	60,6	61,6	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,7	68,7
18°	54,9	55,9	56,9	57,9	58,9	59,9	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,0	69,0
17°	55,3	56,3	57,3	58,3	59,3	60,3	61,3	62,2	63,3	64,3	65,3	66,3	67,3	68,3	69,3
16°	55,6	56,6	57,6	58,6	59,6	60,6	61,7	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,7	68,7	69,7
15°	56,0	57,0	58,0	59,0	60,0	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,0	69,0	70,0
14°	56,3	57,3	58,3	59,3	60,3	61,3	62,3	63,3	64,3	65,3	66,3	67,3	68,3	69,3	70,3
13°	56,7	57,7	58,7	59,7	60,7	61,7	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,7	68,7	69,6	70,6
12°	57,0	58,0	59,0	60,0	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,0	69,0	70,0	71,0
11°	57,4	58,4	59,4	60,4	61,4	62,4	63,4	64,4	65,4	66,4	67,3	68,3	69,3	70,3	71,3
10°	57,8	58,8	59,7	60,7	61,7	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,6	68,6	69,6	70,6	71,6
	71c	72c	73c	74c	75c	76c	77c	78c	79c	80c	81c	82c	83c	84c	85c
30°	66,1	67,1	68,2	69,2	70,3	71,3	72,3	73,3	74,4	75,4	76,4	77,5	78,6	79,6	80,6
29°	66,4	67,4	68,5	69,5	70,6	71,6	72,6	73,7	74,7	75,7	76,7	77,8	78,9	79,9	80,9
28°	66,8	67,8	68,8	69,9	70,9	71,9	73,0	74,0	75,0	76,0	77,1	78,1	79,2	80,2	81,2
27°	67,1	68,1	69,2	70,2	71,2	72,2	73,3	74,3	75,3	76,3	77,4	78,4	79,5	80,5	81,5
26°	67,4	68,4	69,5	70,5	71,5	72,5	73,6	74,6	75,6	76,7	77,7	78,7	79,8	80,8	81,8
25°	67,8	68,8	69,8	70,8	71,8	72,8	73,9	74,9	76,0	77,0	78,0	79,0	80,1	81,1	82,1
24°	68,1	69,1	70,1	71,2	72,2	73,2	74,2	75,5	76,6	77,6	78,6	79,6	80,7	81,7	82,7
23°	68,4	69,4	70,5	71,5	72,5	73,5	74,5	75,2	76,3	77,3	78,3	79,3	80,4	81,4	82,4
22°	68,8	69,8	70,8	71,8	72,8	73,8	74,8	75,9	76,9	77,9	78,9	79,9	81,0	82,0	83,0
21°	69,1	70,1	71,1	72,1	73,1	74,1	75,2	76,2	77,2	78,2	79,2	80,2	81,3	82,3	83,3
20°	69,4	70,4	71,4	72,4	73,4	74,4	75,5	76,5	77,5	78,5	79,5	80,5	81,6	82,6	83,6
19°	69,7	70,7	71,7	72,7	73,7	74,7	75,8	76,8	77,8	78,8	79,8	80,8	81,9	82,9	83,9
18°	70,0	71,0	72,0	73,0	74,0	75,1	76,1	77,1	78,1	79,1	80,1	81,1	82,1	83,1	84,1
17°	70,3	71,3	72,3	73,3	74,3	75,4	76,4	77,4	78,4	79,4	80,4	81,4	82,4	83,4	84,4
16°	70,7	71,7	72,7	73,7	74,7	75,7	76,7	77,7	78,7	79,7	80,7	81,7	82,7	83,7	84,7
15°	71,0	72,0	73,0	74,0	75,0	76,0	77,0	78,0	79,0	80,0	81,0	82,0	83,0	84,0	85,0
14°	71,3	72,3	73,3	74,3	75,3	76,3	77,3	78,3	79,3	80,3	81,3	82,3	83,3	84,3	85,3
13°	71,6	72,6	73,6	74,6	75,6	76,6	77,6	78,6	79,6	80,6	81,6	82,6	83,6	84,6	85,5
12°	72,0	72,9	73,9	74,9	75,9	76,9	77,9	78,9	79,9	80,9	81,9	82,9	83,9	84,8	85,8
11°	72,3	73,2	74,2	75,2	76,2	77,2	78,2	79,2	80,2	81,2	82,2	83,1	84,1	85,1	86,1
10°	72,6	73,5	74,5	75,5	76,5	77,5	78,5	79,5	80,5	81,5	82,4	83,4	84,4	85,4	86,4
	86c	87c	88c	89c	90c	91c	92c	93c	94c	95c	96c	97c	98c	99c	100c
30°	81,7	82,7	83,8	84,9	86,0	87,1	88,2	89,3	90,4	91,5	92,7	93,8	95	96,1	97,7
29°	82,0	83,0	84,1	85,1	86,2	87,3	88,4	89,5	90,6	91,7	92,9	94,1	95,2	96,3	97,5
28°	82,3	83,3	84,4	85,4	86,5	87,6	88,7	89,8	90,9	92,0	93,2	94,3	95,4	96,5	97,7
27°	82,6	83,6	84,7	85,7	86,7	87,9	89,0	90,1	91,1	92,2	93,4	94,5	95,6	96,7	97,9
26°	82,9	83,9	84,9	86,0	87,1	88,2	89,2	90,3	91,4	92,5	93,6	94,7	95,8	96,9	98,1
25°	83,2	84,3	85,2	86,3	87,4	88,4	89,5	90,6	91,6	92,7	93,8	94,9	96,0	97,1	98,2
24°	83,5	84,5	85,5	86,5	87,6	88,7	89,7	90,8	91,9	93,0	94,1	95,2	96,2	97,3	98,4
23°	83,8	84,8	85,8	86,8	87,9	89,0	90,0	91,1	92,1	93,2	94,3	95,4	96,5	97,5	98,6
22°	84,0	85,0	86,1	87,1	88,2	89,2	90,2	91,3	92,4	93,4	94,5	95,6	96,7	97,7	98,8
21°	84,3	85,3	86,4	87,4	88,4	89,5	90,5	91,6	92,6	93,7	94,7	95,8	96,9	97,9	99,0
20°	84,6	85,6	86,6	87,7	88,7	89,7	90,8	91,8	92,9	93,9	95,0	96,0	97,1	98,1	99,1
19°	84,9	85,9	86,9	87,9	88,9	90,0	91,1	92,1	93,1	94,1	95,2	96,2	97,3	98,3	99,3
18°	85,2	86,2	87,2	88,2	89,2	90,2	91,3	92,3	93,3	94,3	95,4	96,4	97,4	98,5	99,5
17°	85,4	86,4	87,4	88,4	89,5	90,5	91,5	92,6	93,6	94,6	95,6	96,6	97,6	98,7	99,7
16°	85,7	86,7	87,7	88,7	89,7	90,8	91,8	92,8	93,8	94,8	95,8	96,7	97,8	98,8	99,8
15°	86,0	87,0	88,0	89,0	90,0	91,0	92,0	93,0	94,0	95,0	96,0	97,0	98,0	99,0	100
14°	86,3	87,3	88,2	89,2	90,2	91,2	92,2	93,2	94,2	95,2	96,2	97,2	98,2	99,2	
13°	86,5	87,5	88,5	89,5	90,5	91,5	92,5	93,5	94,4	95,4	96,4	97,4	98,4	99,3	
12°	86,8	87,8	88,7	89,7	90,7	91,7	92,7	93,7	94,7	95,6	96,6	97,6	98,5	99,5	
11°	87,1	88,0	89,0	90,0	91,0	92,0	92,9	93,9	94,9	95,8	96,8	97,8	98,7	99,7	
10°	87,4	88,3	89,3	90,2	91,2	92,2	93,2	94,2	95,1	95,0	97,0	98,0	98,9	99,9	

Fonte: L.C.Q.Pq. Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa. Prado Velho - Curitiba – Paraná,2017.