

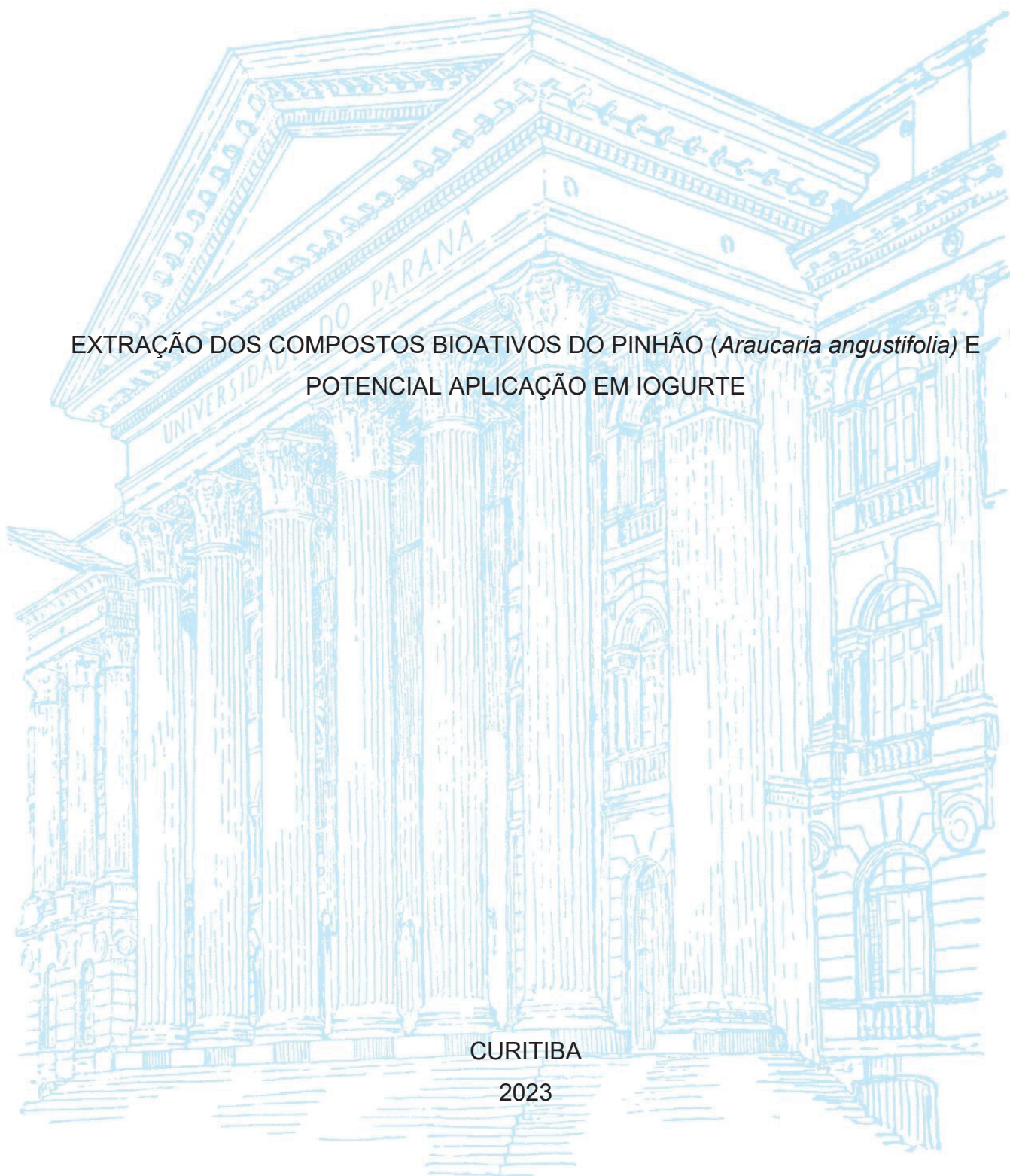
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE SPECHT MALTA

EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO PINHÃO (*Araucaria angustifolia*) E
POTENCIAL APLICAÇÃO EM IOGURTE

CURITIBA

2023



DANIELLE SPECHT MALTA

EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO PINHÃO (*Araucaria angustifolia*) E
POTENCIAL APLICAÇÃO EM IOGURTE

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Masson
Coorientadora: Dra. Cristiane Vieira Helm

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Malta, Danielle Specht

Extração dos compostos bioativos do pinhão (*Araucaria angustifolia*) e potencial aplicação em iogurte / Danielle Specht Malta. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Maria Lúcia Masson

Coorientador: Cristiane Vieira Helm

1. *Araucaria angustifolia*. 2. Agricultura familiar. 3. Culinária (iogurte). I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Masson, Maria Lúcia. IV. Helm, Cristiane Vieira. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DANIELLE SPECHT MALTA** intitulada: **Extração dos compostos bioativos do pinhão (*Araucaria angustifolia*) e potencial aplicação em iogurte**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA LUCIA MASSON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica

06/06/2023 14:00:21.0

MARIA LUCIA MASSON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/06/2023 16:20:50.0

ALLINE ARTIGIANI LIMA TRIBST

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Assinatura Eletrônica

06/06/2023 14:11:40.0

ALESSANDRA CRISTINA PEDRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

06/06/2023 09:56:21.0

SUELEN ÁVILA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO)

Assinatura Eletrônica

07/06/2023 09:53:47.0

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Lucia Masson (UFPR) pela orientação, por todos os ensinamentos, encorajamento e empatia.

A pesquisadora Dra. Cristiane Vieira Helm (Embrapa), pela coorientação, por todas contribuições que foram dadas profissionais e pessoalmente. Sou grata demais por todo o carinho com que tive a oportunidade de ter, você é excelente, um exemplo de inspiração.

À minha família que mesmo a distância sempre me incentivou, me cuidou para que eu conseguisse finalizar essa etapa. Me deu força, me admirou. Minha mãe sempre me visitando quando podia, minha família sempre fazendo as comidas gostosas para que pudéssemos ter breves e bons momentos.

Ao meu companheiro Lucas Fioreze e sua família por ter acompanhado toda a trajetória do doutorado, auxiliando no que foi preciso.

A todos meus amigos de vida, que me sempre entenderam minha vida, e estavam torcendo por mim, confraternizando na minha cidade quando possível! Em especial a Anne, que me ajudou a montar os mapas dos municípios.

Ao meu amigo Edu, que é a pessoa mais querida que conheci na vida, onde aprendi muito a conduzir e tentar passar as coisas na melhor forma.

Aos meus amigos e colegas do PPGEAL gratidão por todo apoio, tenho certeza que com vocês ficou mais leve o doutorado. Principalmente Ivisson, Thay, Bianca, Mônica, Anely, Deo, Luana, Michele, Ana Paula que estavam sempre me ajudando nos experimentos, na escrita, incentivando e parceiros de saídas!

Aos colegas Carol, Wédislely, Fernando por toda a ajuda e instruções para conduzir a tese, com fase experimental das extrações e aplicação no iogurte.

Ao pessoal da Embrapa, em especial ao Gabriel por toda a ajuda nos artigos, aprendi tanto que nem consigo mensurar tamanha gratidão. Ao Matheus, Day, Fabrício, Alessandra, Washington, Gisele e André pelas ajudas nos laboratórios, com ideias e aprendizados.

Aos colegas dos laboratórios do PPGEAL, aos departamentos de Nutrição, Química, Bioquímica e Farmácia, pela oportunidade de uso do laboratório e suas disponibilidades de tempo em meio a pandemia.

À UFPR pela oportunidade de fazer o doutorado, em especial ao PPGEAL.

À CAPES e Embrapa Florestas apoio financeiro.

RESUMO

O pinhão é a semente do Pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*). A sua porção comestível contém nutrientes como fibras alimentares, minerais e amido resistente, enquanto a casca apresenta compostos bioativos com ação antioxidante, os quais possibilitam diversas aplicações. No entanto, são escassos os estudos que investigaram a casca e a semente de pinhão e ainda não foi reportado na literatura aplicações em produtos lácteos. Nesse sentido, esta tese teve como objetivo investigar as variações na composição nutricional dos pinhões coletados em diferentes locais, maximizar a extração de compostos fenólicos da casca do pinhão e avaliar o impacto da adição do extrato bioativo e da semente em iogurte. Para esse intuito, a composição nutricional, minerais e cor da semente do pinhão cozida de 5 locais de coleta foram comparados com as variáveis ambientais e geográficas. A extração de compostos fenólicos da casca de pinhão foi realizada pelos métodos de Infusão e Shaker. Dessa forma, com intuito de maximizar as extrações, os planejamentos fatoriais completos foram aplicados. Para o método de Infusão avaliou-se a influência das variáveis tamanho de partícula (225 a 567 μm), proporção de sólidos:solvente (4,17 a 12,50% (m/v)) e tempo (5 a 30 min). Para o método de Shaker o tempo foi diferente (15 a 45 min) e houve a inclusão da temperatura (25 a 50 $^{\circ}\text{C}$). Os extratos produzidos nas condições maximizadas de ambos os métodos foram comparados com o obtido por extração convencional (Soxhlet) em relação aos compostos bioativos e potencial antioxidante. A semente e o extrato da casca foram aplicados em iogurte e investigados quanto seu impacto nutricional, biodigestibilidade de proteínas, bioacessibilidade de compostos bioativos, potencial antioxidante e estabilidade no período de 30 dias de armazenamento. Como resultado, observou-se que a localização influenciou na variação da composição nutricional da semente de pinhão cozida nos conteúdos de umidade, amido total, proteínas e minerais. Possivelmente, devido a condições climáticas e geográficas diferentes. A eficiência da extração de compostos fenólicos foi melhor quando o tamanho de partícula foi reduzido (225 μm), menores proporções de sólido em relação ao solvente (4,17%), maiores tempos e temperaturas, 30 min pela Infusão e 45 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ por Shaker. O método de extração por Shaker foi escolhido para aplicação em iogurte, pois apresentou maior eficiência de extração em relação ao de Infusão, mas inferior ao de Soxhlet. O uso combinado do extrato e de semente de pinhão cozida (0%, 5% e 10% (m/m)), antes ou após a fermentação do iogurte, manteve a estabilidade nos 30 dias de armazenamento, sem influência na digestibilidade das proteínas, aumento dos compostos fenólicos, flavonoides e o potencial antioxidante. A bioacessibilidade dos compostos bioativos e o potencial antioxidante foram melhorados após a digestão *in vitro*, sendo o uso de 5% de semente do pinhão adicionado depois da fermentação a melhor opção para aproveitar os nutrientes. Portanto, esta tese mostrou que é possível obter composições de pinhão diferentes de acordo com sua origem; a obtenção de extratos bioativos a partir de casca seca fornece um alto conteúdo de fenólicos que potencializa a ação antioxidante, podendo ser aplicado em diversos segmentos, como os alimentícios, os cosméticos e os fármacos; a adição da semente de pinhão e do extrato ao iogurte contribuiu para o desenvolvimento de um novo produto, principalmente com a inclusão de fibras alimentares, amido resistente, que beneficia o valor nutricional e aumenta o valor agregado do pinhão.

Palavras-chave: Pinheiro do Paraná. Agricultura familiar. Desenvolvimento de produtos. Iogurte com pinhão.

ABSTRACT

Pinhão is the seed of the Paraná Pine (*Araucaria angustifolia*). Its edible portion contains nutrients such as dietary fiber, minerals and resistant starch, while the peel has bioactive compounds with antioxidant action, which enable several applications. However, there are few studies that investigated the bark and the pinhão seed and applications in dairy products have not yet been reported in the literature. In this sense, this thesis aimed to investigate the variations in the nutritional composition of pinhão collected in different locations, maximize the extraction of phenolic compounds from the pine nut shell and evaluate the impact of adding the bioactive extract and the seed in yogurt. For this purpose, the nutritional composition, minerals and color of the cooked pinhão seed from 5 collection sites were compared with environmental and geographic variables. Extraction of phenolic compounds from pinhão bark was performed by Infusion and Shaker methods. Thus, in order to maximize extractions, full factorial designs were applied. For the Infusion method, the influence of the variables particle size (225 to 567 μm), solids:solvent ratio (4.17 to 12.50% (m/v)) and time (5 to 30 min) was evaluated. For the Shaker method, the time was different (15 to 45 min) and temperature (25 to 50 °C) was included. The extracts produced under maximized conditions of both methods were compared with those obtained by conventional extraction (Soxhlet) in relation to bioactive compounds and antioxidant potential. The seed and bark extract were applied to yogurt and investigated for their nutritional impact, protein biodigestibility, bioaccessibility of bioactive compounds, antioxidant potential and stability within 30 days of storage. As a result, it was observed that the location influenced the variation in the nutritional composition of the cooked pinhão seed in terms of moisture content, total starch, protein and minerals. Possibly due to different climatic and geographic conditions. The efficiency of extraction of phenolic compounds was better when the particle size was reduced (225 μm), lower proportions of solid in relation to the solvent (4.17%), higher times and temperatures, 30 min by Infusion and 45 min, 50 °C by Shaker. The Shaker extraction method was chosen for application in yogurt, as it presented greater extraction efficiency compared to Infusion, but lower than Soxhlet. The combined use of extract and cooked pinhão seed (0%, 5% and 10% (m/m)), before or after yoghurt fermentation, maintained stability over 30 days of storage, with no influence on protein digestibility increase in phenolic compounds, flavonoids and antioxidant potential. The bioaccessibility of bioactive compounds and the antioxidant potential were improved after *in vitro* digestion, with the use of 5% pine nut seed added after fermentation being the best option to take advantage of the nutrients. Therefore, this thesis showed that it is possible to obtain different pine nut compositions according to their origin; obtaining bioactive extracts from dry bark provides a high phenolic content that enhances the antioxidant action, and can be applied in various segments, such as food, cosmetics and pharmaceuticals; the addition of pinhão seed and extract to yogurt contributed to the development of a new product, mainly with the inclusion of dietary fibers, resistant starch, which improves the nutritional value and increases the added value of pinhão.

Keywords: Paraná pine. Family farming. Environmental sustainability. Product development. Yogurt with pinhão.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ÁRVORE DA <i>Araucaria angustifolia</i> E A PRODUÇÃO DE PINHÕES...	17
FIGURA 2 - VISTA DAS CAMADAS DE TECIDO DO TEGUMENTO (CASCA DE PINHÃO) DA <i>Araucaria angustifolia</i>	20
FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS FITOESTERÓIS	28
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS MUNICÍPIOS DE COLETA DO PINHÃO DO ESTUDO	32
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO PROJETO	34
FIGURA 6 – OBTENÇÃO DAS CASCAS DO PINHÃO PARA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	36
FIGURA 7 - OBTENÇÃO DOS IOGURTES COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE CASCA (ECP) E SEMENTE DE PINHÃO	41
FIGURA 8 - DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	51
FIGURA 9 – CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE PINHÃO DE CINCO LOCALIDADES DA REGIÃO SUL DO BRASIL	57
FIGURA 10 - CONTRIBUIÇÃO DOS MACROELEMENTOS DIÁRIA (A), INGESTÃO DIETÉTICA RECOMENDADA (RDA) (B)	61
FIGURA 11 - ESPAÇOS DE CORES CIELAB DAS SEMENTES DE PINHÃO COZIDAS DE DIFERENTES ORIGENS	63
FIGURA 12 – ANÁLISE MULTIVARIADA DAS VARIÁVEIS NUTRICIONAIS E AMBIENTAIS DE SEMENTES DE PINHÃO DE DIFERENTES ORIGENS.....	64
FIGURA 13 – CONTRIBUIÇÃO DA PCA POR VARIÁVEIS DAS DIM 1 (A), DIM 2 (B) E PERCENTAGEM DE EXPLICAÇÃO DAS VARIÂNCIAS (C)	66
FIGURA 14 - FRAÇÕES OBTIDAS NAS DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHO DE PARTÍCULA DA CASCA.....	71
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MÉDIA DE CASCA DE PINHÃO (%) COM PENEIRAMENTO MANUAL E MECÂNICA...	72
FIGURA 16 - COMPARAÇÃO DA COR DOS EXTRATOS MAXIMIZADOS EM RELAÇÃO AO MÉTODO CONVENCIONAL.....	79
FIGURA 17 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE PINHÃO PELOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	81

FIGURA 18 - EXTRATO BIOATIVO DE CASCA DE PINHÃO E IOGURTES	84
FIGURA 19 – BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM IOGURTES ADICIONADOS DE EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO	85
FIGURA 20 - REDUÇÃO DO pH DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO LEITE PARA ELABORAÇÃO DE IOGURTE COM ADIÇÃO DE SEMENTE DE PINHÃO	87
FIGURA 21 - BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DOS IOGURTES ADICIONADOS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ETAPAS, COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (ECP)	93
FIGURA 22 - FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADO DE SEMENTE PINHÃO (SP) E EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (ECP)	96
FIGURA 23 - ANÁLISE QUÍMICA DE RMN EM ¹ H DOS SOROS DE IOGURTE ADICIONADOS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP).....	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PESQUISAS REALIZADAS COM A CASCA DE PINHÃO RELATADAS NA LITERATURA.....	22
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE PARTÍCULAS DA CASCA DE PINHÃO APÓS MOAGEM.....	36
TABELA 3 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO POR INFUSÃO.....	37
TABELA 4 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO POR SHAKER.....	38
TABELA 5 – PARÂMETROS DE COR DA SEMENTE DE PINHÃO COZIDA	63
TABELA 6 - VARIÁVEIS AMBIENTAIS DOS MUNICÍPIOS ENVOLVIDOS NO ESTUDO	68
TABELA 7 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE PINHÃO POR INFUSÃO (I) 2 ³ E SHAKER (S) 2 ⁴	74
TABELA 8 - ANÁLISE DE RENDIMENTO E COMPOSTOS BIOATIVOS PARA OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CASCA DE PINHÃO	75
TABELA 9 - ANÁLISE DA VIDA ÚTIL DOS IOGURTES ADICIONADOS DE EXTRATO DA CASCA DO PINHÃO (ECP)	83
TABELA 10 - PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DE GOMPERTZ MODIFICADA ADAPTADA PARA CURVAS DE FERMENTAÇÃO COM REDUÇÃO DO pH EM FORMULAÇÕES DE IOGURTES ADICIONADAS DE 0,5 E 10% DE SEMENTE DE PINHÃO (SP) ANTES DA FERMENTAÇÃO	88
TABELA 11 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE IOGURTES ADICIONADOS DE 0, 5 E 10% DE SEMENTE DE PINHÃO COZIDA (SP), EM BASE ÚMIDA	90
TABELA 12 – VIDA ÚTIL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.....	95

TABELA 13 - ACIDEZ E pH DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.....	97
TABELA 14 – ANÁLISES DE COR DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.....	98
TABELA 15 – CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA), SINERÉSE E VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association Of Official Analytical Chemistry</i>
ABTS	Método analítico de atividade antioxidante baseado no radical ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico
BIT	Bituruna/PR
CAÇ	Caçador/SC
Cam	Campesterol
CP	Casca de pinhão
CG-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama
CG-MS	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa
CM	Cruz Machado/PR
DPPH	Método analítico de atividade antioxidante baseado no sequestro dos radicais livres por 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ECP	Extrato de casca de pinhão
Est	Estigmasterol
FRAP	Método analítico de atividade antioxidante de redução do ferro (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
G	Granulometria da casca de pinhão triturada.
LAP	Lapa/PR
LAB	bactérias do ácido láctico
LB	Liebermann–Buchard
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
S/S	Proporção sólido/solvente
SP	Semente de pinhão
SJT	São João do Triunfo/PR
T	Temperatura de processo
t	Tempo de processo
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- ácido carboxílico
β-sit	β-sitosterol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	PINHÃO	15
3.1.1	Importância econômica e ambiental do pinhão (<i>Araucaria angustifolia</i>).....	15
3.1.2	Características da Araucária e do pinhão.....	16
3.1.3	Semente de pinhão.....	18
3.1.4	Casca de pinhão.....	20
3.2	COMPOSTOS BIOATIVOS	25
3.2.1	Antioxidantes	25
3.2.2	Compostos com propriedades antioxidantes	26
3.2.3	Fitoesteróis	28
3.3	IOGURTE	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	MATÉRIA-PRIMA	32
3.1.1	Obtenção dos pinhões para avaliar o efeito da origem na composição nutricional da semente	32
3.1.2	Obtenção dos pinhões para avaliar a casca, seus extratos e elaboração do iogurte	33
3.2	ESCOPO DO TRABALHO.....	33
3.3	PREPARO DOS PINHÕES	35
3.3.1	Preparo para avaliação do efeito da origem na composição nutricional e aplicação em iogurte	35
3.3.2	Preparo para avaliar a casca e seus extratos.....	35
3.4	PREPARO DOS EXTRATOS BIOATIVOS DA CASCA DE PINHÃO	37
3.4.1	Extração por Infusão.....	37
3.4.2	Extração por agitação orbital em equipamento tipo Shaker	38
3.4.3	Recuperação e rendimento do extrato por Infusão e Shaker	38
3.4.4	Extração por Soxhlet	39
3.4.5	Obtenção dos extratos em pó.....	39

3.5	ELABORAÇÃO DOS IOGURTES.....	39
3.6	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	42
3.6.1	Caracterizações.....	42
3.6.1.1	Composição centesimal.....	42
3.6.1.2	Minerais	43
3.6.1.3	Valor nutricional	43
3.6.1.4	Análise dos componentes colorimétricos $L^* a^* b^*$	43
3.6.2	Análise dos compostos bioativos	44
3.6.2.1	Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas	44
3.6.2.2	Compostos fenólicos totais.....	46
3.6.2.3	Atividade antioxidante	46
3.6.2.3.1	Método do Radical ABTS	47
3.6.2.3.2	Método do Radical DPPH.....	47
3.6.2.3.3	Método do Radical FRAP	47
3.6.2.3.4	Flavonoides totais.....	48
3.6.2.3.5	Taninos condensados	48
3.6.2.3.6	Fitosterol total.....	49
3.6.3	Ensaio de toxicidade por <i>Artemia salina</i>	49
3.6.4	Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	50
3.6.4.1	Digestibilidade de proteínas	52
3.6.4.2	Bioacessibilidade dos compostos bioativos.....	52
3.6.5	Estabilidade dos iogurtes na sua vida útil.....	53
3.6.5.1	Acidez e pH	54
3.6.5.1	Capacidade de retenção de água	54
3.6.5.2	Sinérese	54
3.6.5.3	Viscosidade	54
3.6.5.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	55
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	RELACIONANDO A ORIGEM GEOGRÁFICA COM AS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, MINERAIS E VISUAIS DO PINHÃO (SEMENTE DE ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA) DO SUL DO BRASIL.	57
4.1.1	Efeitos da origem do pinhão na composição nutricional da semente de pinhão cozida	57

4.1.2	Contribuição nutricional da semente de pinhão na dieta	60
4.1.3	Avaliação colorimétrica	62
4.1.4	Análise de componentes principais e agrupamento hierárquico por princípio componentes.....	64
4.1.5	Relação do solo, geografia e características ambientais com a composição do pinhão	67
4.1.6	Considerações finais	69
4.2	EXTRATOS BIOATIVOS DA SEMENTE DE PINHÃO (<i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>), APLICAÇÃO EM IOGURTE E BIOACESSIBILIDADE APÓS DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	71
4.2.1	Distribuição do tamanho de partícula	71
4.2.2	Maximização de compostos fenólicos extraídos de casca de pinhão por Infusão e Shaker	72
4.2.3	Comparação dos métodos maximizados com o convencional	75
4.2.3.1	Recuperação e compostos bioativos.....	75
4.2.3.1	Cromatografia gasosa da casca de pinhão seca.....	77
4.2.3	Componentes colorimétricos $L^* a^* b^*$	78
4.2.4	Ensaio de toxicidade por incubação de <i>Artemia salina</i>	79
4.2.5	Componentes principais e cluster de extrações maximizadas por Soxhlet ..	80
4.2.6	Adição de extrato em iogurte	82
4.2.6.1	Vida útil dos iogurtes	82
4.2.6.2	Digestibilidade gastrointestinal <i>in vitro</i> dos iogurtes	84
4.2.7	Considerações finais	86
4.3	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SEMENTE DE PINHÃO EM IOGURTE NA DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> E ESTABILIDADE POR 30 DIAS	87
4.3.1	Cinética de fermentação do leite para elaboração de iogurte.....	87
4.3.2	Caracterização da semente de pinhão e dos iogurtes	89
4.3.3	Digestibilidade das proteínas e dos compostos bioativos no iogurte.....	91
4.3.3.1	Digestibilidade de proteínas	91
4.3.3.2	Bioacessibilidade dos compostos bioativos das formulações de iogurte	92
4.3.4.1	Compostos bioativos	94
4.3.4.2	Acidez, pH e cor	96
4.3.5	Influência da adição do pinhão na composição química dos iogurtes	101
4.3.6	Considerações finais	102

5 CONCLUSÃO	104
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	106
REFERÊNCIAS.....	108
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	123
S1 MATERIAL E MÉTODOS	123
S1.1 Índice de Continentalidade de Johansson	123
S1.2 Índice de Oceanidade de Kerner	123
S1.3 Índice de Oceanidade de Marsz (MOI)	124
S1.4 Índice de Aridez De Martonne	124
S1.5 Índice Combinativo Pinna	124
TABELAS REFERENTES AO ITEM 4.1	125
FIGURAS REFERENTES AO ITEM 4.1.....	129
TABELAS REFERENTES AO ITEM 4.2	131
TABELAS REFERENTES AO ITEM 4.3	137
FIGURAS REFERENTES AO ITEM 4.3.....	139
ANEXO A – LISTA DO LOCAL DAS ANÁLISES	140

1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é encontrada em clima subtropical de montanha no sul do Brasil, leste do Paraguai e nordeste da Argentina. Também conhecida como Pinheiro do Paraná, possui grande importância econômica, cultural e social (PERALTA et al., 2016). Sua semente, chamada de pinhão é a parte comestível da Araucária (BRANCO et al., 2016), é um produto sazonal importante para a agricultura familiar e geração de renda para pequenos produtores (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012). Em 2021 movimentou R\$ 17,5 milhões de reais, sendo as regiões Central, Sul, e Sudoeste as que concentram o maior volume de produção de pinhão (PARANÁ, 2021).

A semente do pinhão apresenta alto valor nutricional (BARBOSA et al., 2019; GIL et al., 2021; SILVA et al., 2022), sua porção comestível (semente) corresponde em média a 70% do pinhão e o restante é a casca 30% (CLADERA-OLIVERA et al., 2008; GIL et al., 2021). O pinhão possui em média 46,9% de umidade, em base seca contém 2,9% de cinzas, 7,9% de proteínas, 0,8% de lipídios, 11,1% de fibras alimentares insolúveis, 2,82% de fibras solúveis. Contém 400 mg/100 g de P, 1531 mg/100 g de K, 112 mg/100 g de Ca, 60 mg/100 g de Mg, 0,72 mg/100 g de Cu, 2,98 mg/100 g de Fe, 0,46 mg/100 g de Mn e 2,56 mg/100 g de Zn. Sendo fonte de minerais, como fósforo, manganês, cobre, molibdênio e cromo, que podem mudar conforme os locais de coleta (BARBOSA et al., 2019).

O pinhão possui baixo perfil glicêmico, atribuído a presença de fibras alimentares e ao amido resistente. Desse modo, o pinhão é considerado um produto nutracêutico por reduzir riscos de *Diabetes Mellitus*, doenças cardiovasculares, câncer de cólon e obesidade (AO et al., 2007; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010; ZHANG; SOFYAN; HAMAKER, 2008). Ainda, o pinhão contém compostos fenólicos, como a catequina, ácido gálico e quercetina (CORDENUNSI et al., 2004; KOEHNLEIN et al., 2012) bem como quantidades significativas dos fitoesteróis β -sitosterol e estigmasterol (SILVA et al., 2016).

A casca do pinhão é fonte de fibras alimentares, minerais e compostos fenólicos com atividade antioxidante (BRANCO et al., 2015; CORDENUNSI et al., 2004; DAUDT et al., 2015; MOTA et al., 2014; SANT'ANNA et al., 2016). O extrato da casca de pinhão contém taninos condensáveis e estes compostos são inibidores

eficazes de lipases pancreáticas (OLIVEIRA et al., 2015), das α -amilases salivares e pancreáticas (DA SILVA et al., 2014).

A semente e casca de pinhão têm sido utilizadas em formulações alimentícias (IKEDA et al., 2018; PERALTA et al., 2016), cosméticas (DAUDT et al., 2015; MOTA et al., 2014), filmes biodegradáveis (DAUDT et al., 2016, 2017) e encapsulações (FONSECA et al., 2020; PERALTA et al., 2016; SPADA et al., 2012). No entanto, o aproveitamento integral do pinhão (casca e semente) ainda foi pouco investigado e aplicado na área de laticínios. Nesse sentido, investigar o impacto da aplicação do pinhão em iogurte torna-se interessante, uma vez que o iogurte é consumido pelos humanos há milhares de anos, devido seu alto valor nutricional e boa digestibilidade, atribuída à presença de peptídeos bioativos e microrganismos probióticos (HELAL; TAGLIAZUCCHI, 2018). Comumente, o iogurte é enriquecido com especiarias, frutas, sementes ou extratos a fim de introduzir polifenóis e fibras ao produto (ARYANA; OLSON, 2017; TSENG; ZHAO, 2013), visto que a matriz do iogurte é um excelente veículo de entrega para compostos polifenólicos derivados de plantas (DIEP; YOO; RUSH, 2022), principalmente devido ao seu baixo pH, o que aumenta a estabilidade dos compostos fenólicos durante o armazenamento (HELAL; TAGLIAZUCCHI, 2018). A presença de proteínas ou grandes peptídeos e gorduras mantém a integridade dos polifenóis durante a digestão, aumentando sua bioacessibilidade (TAGLIAZUCCHI et al., 2012).

Estudos correlacionando a composição nutricional de diferentes locais de coleta do pinhão com as variáveis ambientais e geográficas, bem como maximizar a extração dos compostos bioativos da casca de pinhão por métodos viáveis para indústria, além de investigar a aplicação e bioacessibilidade dos seus componentes benéficos para saúde em iogurte são necessários. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar as variações na composição nutricional dos pinhões coletados em diferentes locais, maximizar a extração de compostos fenólicos da casca de pinhão e avaliar o impacto da adição do extrato e da semente em iogurte.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar as variações na composição nutricional dos pinhões coletados em diferentes locais, maximizar a extração de compostos fenólicos da casca do pinhão e avaliar o impacto da adição do extrato e da semente em iogurte.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Correlacionar a composição nutricional, mineral e cor de pinhões cozidos com variáveis ambientais e geográficas;
- b. Analisar a influência da granulometria, proporção de sólido em relação ao solvente, temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos totais da casca de pinhão pelos métodos de extração por Infusão e Shaker;
- c. Avaliar a recuperação, os compostos bioativos e o potencial antioxidante dos extratos bioativos da casca do pinhão obtidos pelos métodos de extração por Infusão e Shaker e comparar com a extração por Soxhlet;
- d. Determinar o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e potencial antioxidante das formulações de iogurte adicionado de extrato bioativo da casca do pinhão antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*;
- e. Verificar o impacto da adição de diferentes concentrações da semente cozida do pinhão antes e após a fermentação do iogurte e sua influência na composição nutricional;
- f. Analisar a digestibilidade da proteína das formulações de iogurte;
- g. Avaliar a biodisponibilidade dos fenólicos totais, flavonoides totais e potencial antioxidante das formulações de iogurte;
- h. Verificar os fenólicos totais, flavonoides totais e potencial antioxidante, acidez, pH, capacidade de retenção de água, sinérese, viscosidade e composição química das formulações de iogurte após 30 dias de armazenamento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PINHÃO

Nessa revisão foi abordada a importância econômica e ambiental do pinhão (*Araucaria angustifolia*), as características da árvore *A. angustifolia* e do pinhão, composição da semente e casca, compostos bioativos com potencial antioxidante e iogurte.

3.1.1 Importância econômica e ambiental do pinhão (*Araucaria angustifolia*)

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze é popularmente conhecida como pinheiro do Paraná, pinheiro brasileiro ou simplesmente "Araucária". Ocorre naturalmente no Brasil e em partes na Argentina e no Paraguai e está localizada entre as latitudes 19° e 31° Sul e entre as longitudes 41° e 54° Oeste, principalmente nos estados do Paraná (40%), de Santa Catarina (31%) e do Rio Grande do Sul (25%) (CARVALHO, 1994).

No Brasil, a área original, de formato irregular, foi de cerca de 200 mil quilômetros quadrados e o seu ecossistema original, a Floresta Ombrófila Mista (FOM), chegou a ocupar cerca de 20 milhões de hectares (SEITZ, 1986). No entanto, a exploração madeireira reduziu drasticamente a quantidade de espécies, restando apenas cerca de 2 a 4% da original (MANTOVANI; MORELLATO; DOS REIS, 2004; SANTOS et al., 2015). Por este motivo, tal espécie está na lista de extinção desde a segunda metade do século XX. Dessa forma, a araucária está entre as espécies florestais nativas brasileiras mais emblemáticas tanto para população em geral, quanto para pesquisadores, legisladores e profissionais florestais (EMBRAPA, 2020a).

Nessa conjuntura, alternativas estão sendo realizadas para que as florestas de araucárias tenham continuidade, uma vez que, as florestas naturais têm papel importante no equilíbrio da vida terrestre e sua manutenção, no caso das Florestas com Araucárias, é exigência legal. A sociedade só se beneficiará com a continuidade e ampliação de florestas nativas e o reflorestamento da espécie, na medida em que, estimular novos plantios e a possibilidade de uso da espécie contribui com geração

de renda para produtores de pinhão e ainda movimentar o cenário econômico de forma sustentável (EMBRAPA, 2020a).

O forte incentivo à produção de pinhão contribuiu para que ele estivesse entre os principais alimentos de extração vegetal em 2021, mostrou sua alta produção, com 12.485 t. Estão também nesta lista a erva-mate (506.134 t), o açaí (227.251 t), o fruto de pequi (74.172 t) e castanha-do-pará (33.406 t) (IBGE, 2021).

A produção de pinhão anual brasileira é 2,6 vezes maior do que em 1986 que produziu 4800 t (IBGE, 2021). Os estados que mais produziram pinhão em 2021 foram Paraná (4.018 t), Santa Catarina (3.916 t) e Minas Gerais (3.464 t). A produção dos municípios envolvidos neste estudo representou 1,79% da produção brasileira, sendo 55 ton (0,58%) em Bituruna/PR (BIT), 50 ton (0,53%) em Cruz Machado/PR (CM), 31 ton (0,33%) em Caçador/SC (CAÇ), 29 ton (0,31%) em Lapa/PR (LAP) e 4 ton (0,04%) em São João do Triunfo/PR (SJT) (IBGE, 2021).

A valorização de resíduos agroindustriais tem atraído o interesse de acadêmicos e indústrias, que contribui para gerar novas alternativas na área dos produtos químicos, materiais e energia, por conseguinte, contribuem com a reutilização e geração de produtos com valores agregados, ou ainda utilizar na elaboração de produtos de base biológica a partir de recursos renováveis. Este é um tema de interesse para o setor das agroindústrias, visto que a economia circular é cada vez mais necessária à sustentabilidade (REZENDE, 2016).

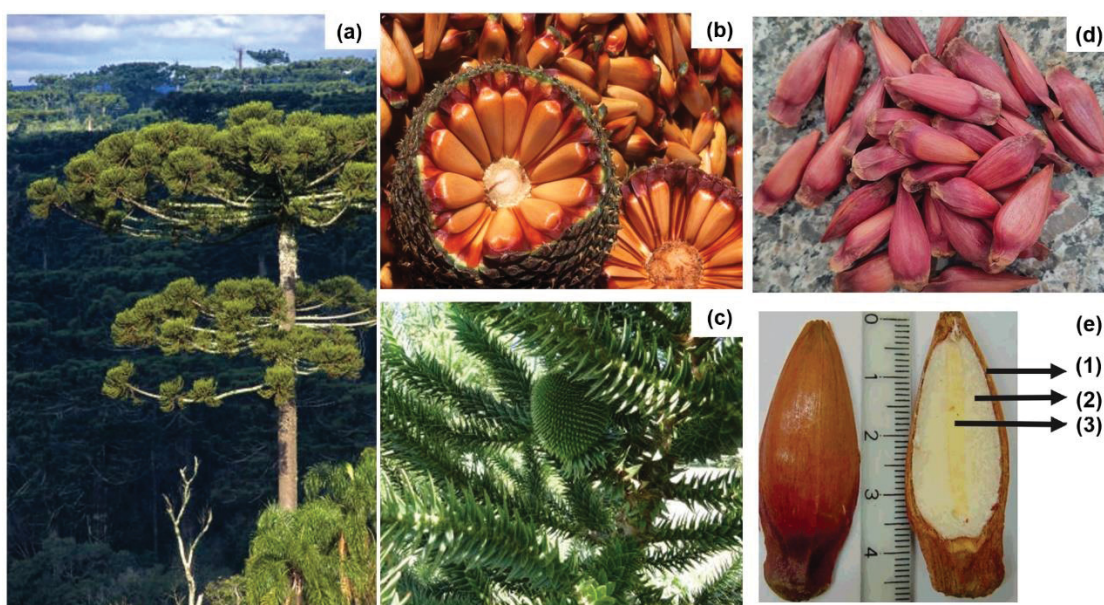
A economia circular tem por objetivo manter produtos, componentes e materiais em seu mais alto nível de utilidade, distinguindo entre ciclos técnicos e biológicos. Esse modelo econômico busca dissociar o desenvolvimento econômico global do consumo de recursos finitos (STAHEL, 2010).

3.1.2 Características da Araucária e do pinhão

A *Araucaria angustifolia* é uma árvore com 20 a 50 m de altura, com um tronco ereto de 90 a 180 cm de diâmetro (FIGURA 1, A) (CARVALHO, 1994). Produz pinhas (FIGURA 1, B e C) com 2,3 kg (peso médio), que comportam ~ 0,8 kg de sementes de pinhão. As sementes medem entre 3 a 8 cm de comprimento, 1 a 2,5 cm de largura e pesam em média 8,7 g (FIGURA 1, D) (PERALTA et al., 2016). A parte comestível do pinhão (semente) (FIGURA 1, E) consiste em uma massa amilácea com textura mais dura quando crua e macia após o cozimento. No centro, existe um filamento em

que aproximadamente 4/5 do comprimento é ocupado pelo embrião, chamado filiforme. A semente é coberta por duas estruturas, uma membrana interna, firmemente aderidos à semente e a uma camada externa, altamente resistentes. A membrana interna e a camada externa têm cores que variam de amarelo a vermelho escuro e são removidas após o cozimento (LEITE et al., 2008).

FIGURA 1 - ÁRVORE DA *Araucaria angustifolia* E A PRODUÇÃO DE PINHÕES



Legenda: Pinheiral de Araucária (*Araucaria angustifolia*), Pinha e seus pinhões (B e C), sementes de pinhão (D) e partes internas do pinhão (E):casca (tegumento); 2:endosperma (semente); 3:embrião. FONTE: A Embrapa (2020c), B e C Embrapa (2020b), D A autora (2020), E adaptado de Cordenunsi et al. (2004).

Os pinhões são encontrados no Brasil em maiores quantidades em abril (outono) a junho (inverno) (AMARANTE et al., 2007), sendo mais consumido no Sul e Sudeste. As preparações são principalmente o pinhão cozido, farinhas, farofas, pratos regionais, bolos, pães e biscoitos ou assados (BRANCO et al., 2016; CORDENUNSI et al., 2004; PERALTA et al., 2016) e nas regiões onde ocorre a árvore, é comum cozinhar em água e em seguida preservá-lo em sal e vinagre (LEITE et al., 2008).

A perecibilidade do pinhão, aliada à falta de industrialização e à sazonalidade de produção, faz com que sua comercialização seja feita quase que totalmente *in natura* e na região de produção. Sendo assim, uma forma de mudar essa realidade, é implantar uma estrutura de armazenamento em câmaras frias com temperatura e umidade controladas a fim de evitar a desidratação e a germinação (AMARANTE et

al., 2007). Para melhorar esse quadro, pesquisas tem sido realizadas para investigar as condições de processamento do pinhão, tais como as características do pinhão cozido com e sem casca (CORDENUNSI et al., 2004; SCHVEITZER et al., 2014; SILVA et al., 2022), bem como as sementes de pinhão e farinhas obtidas a partir delas cruas e cozidas com sua casca (CAPELLA; PENTEADO; BALDI, 2009). Além de estudar a influência de tratamentos térmicos (GAMA et al., 2010).

À vista disso, desenvolver técnicas de industrialização do pinhão e intensificar a sua divulgação como alimento nutritivo, irá favorecer a comercialização fora da época de colheita e o acesso a mercados consumidores fora da área de ocorrência da Floresta com Araucária. Assim, a industrialização do pinhão irá aumentar seu valor agregado, e conseqüentemente, a renda das famílias envolvidas (DANNER; ZANETTE; RIBEIRO, 2012).

3.1.3 Semente de pinhão

A semente de pinhão possui um interessante valor nutricional (GIL et al., 2021; SILVA et al., 2022). É considerada uma fonte excelente de energia e nutrientes, devido à sua constituição de carboidratos complexos, fibras alimentares, especialmente o amido resistente, e apresenta baixo índice glicêmico quando comparado ao do pão produzido com farinha branca (CORDENUNSI et al., 2004). O baixo índice glicêmico é devido principalmente ao alto conteúdo de amilose presente no amido, que contribui para a formação de amido resistente nas sementes após a cocção, e resulta em uma lenta absorção de glicose pelo organismo (CORDENUNSI et al., 2004). Essas características são promissoras para usar o pinhão como ingrediente na produção de alimentos nutracêuticos, tais como shakes e suplementos nutricionais (ZORTÉA-GUIDOLIN et al., 2017). Pode contribuir para prevenção e tratamento de doenças metabólicas crônicas e suas complicações cardiovasculares, como dislipidemia, obesidade e diabetes (BRAND-MILLER; BUYKEN, 2012).

A semente possui baixa quantidade de açúcares solúveis (glicose, sacarose e frutose), os quais são reduzidos na cocção devido a lixiviação (CORDENUNSI et al., 2004). Apesar do conteúdo lipídios, contém ácidos graxos importantes, como o ácido linoléico (18:2n-6), ácido oleico (18:1n-9) e ácido palmítico (16:0), além de α e β -tocoferol e os fitoesteróis β -sitosterol e estigmasterol (SILVA et al., 2016). A semente é fonte de minerais, como potássio, fósforo, manganês, cobre, molibdênio e cromo

(BARBOSA et al., 2019). Contêm altos conteúdos fenólicos, como a catequina, ácido gálico e a quercetina, que são protetores de reações que envolvem a formação de radicais livres (CORDENUNSI et al., 2004; KOEHNLEIN et al., 2012).

A farinha de semente do pinhão é rica em resíduos de glutamato e aspartato e contém pequenas quantidades de histidina e cisteína (LEITE et al., 2008), sendo comparável a outras fontes de proteínas vegetais usadas na dieta humana, como trigo, milho e leguminosas, que são baixos em lisina e histidina em sua composição de aminoácidos (YOUNG; PELLETT, 1994). Além disso, apresenta quantidades de fenilalanina, triptofano e valina similares à caseína e concentrações de valina e metionina mais altas do que na soja.

Tal composição possibilitou a substituição de até 20% de caseína nas dietas para ratos em crescimento, mostrando-se uma proteína de alto de valor biológico (LEITE et al., 2008). Por outro lado, a presença de atividade inibidora da tripsina na farinha, particularmente a lectina, limitou o uso de proporções mais altas de farinha de pinhão na dieta (ASTARITA; FLOH; HANDRO, 2003).

A semente crua é extremamente dura, sendo o processo de cocção importante, para gelatinização do amido e consequente amolecimento da semente (CLADERA-OLIVERA et al., 2008; LEITE et al., 2008; CAPELLA; PENTEADO; BALDI, 2009). Ainda, o cozimento aumenta a umidade, as fibras insolúveis, e o cálcio em comparação com a semente crua. Enquanto as cinzas, as proteínas, as fibras solúveis, o amido e o restante dos minerais (fósforo, magnésio, ferro, zinco e cobre) são reduzidos devido a lixiviação na água de cozimento (CORDENUNSI et al., 2004). Ademais, a cocção das sementes com a casca do pinhão aumenta a quantidade de fenólicos, pois parte dos compostos da casca (revestimento interno) migram para a semente. Por outro lado, o revestimento externo da casca protege a semente da perda de minerais durante a fervura (CORDENUNSI et al., 2004).

Além do valor nutricional das semente mencionado anteriormente, são usadas tradicionalmente para etnomedicina e fins ornamentais, assim como outras partes da árvore da *Araucaria angustifolia* (casca da árvore, resina, nós e folhas) (ASLAM et al., 2013). Suas funções são para o tratamento de azia e anemia (FRANCO; FONTANA, 2001), seu óleo para dores musculares, articulares, inflamações e infecções (CARVALHO, 2003).

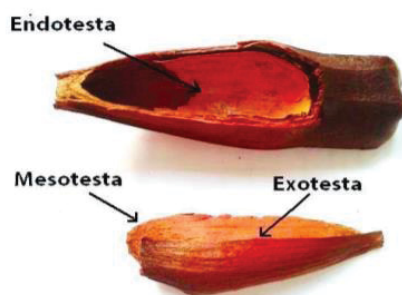
Devido suas importantes propriedades, a semente pode ser utilizada na forma de farinha, isenta de glúten, essencial para indivíduos com doença celíaca (IKEDA et

al., 2018; PERALTA et al., 2016), e o alto conteúdo de fibras permite elaboração de produtos especiais. Por exemplo, preparar bolos com maiores quantidades de fibras e melhor qualidade nutricional com mesclas de farinha de arroz (IKEDA et al., 2018). Outra opção é a extração do amido que chega a 32,5% de rendimento e pureza de 87% (DA COSTA et al., 2013). Assim, seu amido pode ser usado como filmes biodegradáveis à base de amido plastificados com glicerol (DAUDT et al., 2016), agente de encapsulação para evitar a degradação de carotenoides (PERALTA et al., 2016; SPADA et al., 2012), excipiente farmacêutico (DAUDT et al., 2014) e agente de formulações cosméticas (PERALTA et al., 2016).

3.1.4 Casca de pinhão

A casca do pinhão corresponde cerca de 30% do peso total do pinhão em base úmida (CLADERA-OLIVERA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015), normalmente é considerada como resíduo, possui fenólicos com atividade antioxidante que conferem coloração marrom para a mesma (CLADERA-OLIVERA, 2008; SILVA et al., 2016). O pinhão (Figura 1, E) possui uma casca (tegumento) para proteção da semente, e esta casca é composta por três camadas: externa (exotesta), intermediária (mesotesta) e interna (endotesta) (Figura 2) (SAMPAIO et al., 2016).

FIGURA 2 - VISTA DAS CAMADAS DE TECIDO DO TEGUMENTO (CASCA DE PINHÃO) DA *Araucaria angustifolia*



FONTE: Adaptado de Sampaio et al. (2016).

Camadas da casca: interna (endotesta), intermediária (mesotesta) e externa (exotesta).

A camada endotesta é a que apresenta maior concentração de polifenóis. As superfícies externas e internas da endotesta exibem maior saturação de cor, mas a externa apresenta matiz vermelho devido aos fenólicos, enquanto a interna da

endotesta apresenta matiz amarelo (SAMPAIO et al., 2019). Relatos anteriores mostram que a camada externa (exotesta) pode variar de amarelo a marrom-avermelhado, a intermediária (mesotesta) de branco-amarelada a marrom, e interna (endotesta) de marrom a rosa avermelhado (MATTOS, 1994).

A casca ainda é uma fração do pinhão pouco explorada em comparação com a semente. No entanto, nos últimos anos, têm sido realizados estudos importantes para sua aplicação, como identificações de compostos bioativos que contribuem para diferentes propriedades como atividade antioxidante, inibidores de α -amilase, entre outros. As condições de extração e as principais conclusões dos trabalhos relacionados a casca do pinhão podem ser vistas na Tabela 1. Em estudo com nano suspensões de casca de pinhão foi identificado os fitoesteróis como β -sitosterol (44,97 mg/100g), campesterol (6,88 mg/100 g) e estigmasterol (6,88 mg/100 g) (LIMA et al., 2020).

É importante salientar que a quantidade de fenólicos presentes no pinhão cru e cozido são diferentes devido a migração dos compostos presentes na casca para a semente. Por exemplo, não são detectáveis flavonoides na semente crua, a casca interna tem conteúdo de quercetina cinco vezes mais alto que a casca externa. A casca interna da semente tem um alto conteúdo de fenólicos e as sementes cozidas em condições normais (com casca) apresentam conteúdo de fenólicos cinco vezes mais alto que semente cozidas sem casca (CORDENUNSI et al., 2004).

A obtenção de extratos bioativos da casca pode ser realizada por diferentes solventes. No entanto, se o uso for alimentício ou cosmético, é necessário que o solvente não seja tóxico, nem irritável, entre outros atributos, conforme estabelecido pela Farmacopeia Brasileira, na qual há recomendações de uso de solventes menos tóxicos e descreve níveis considerados toxicologicamente aceitáveis para alguns solventes residuais (ANVISA, 2019).

É importante ressaltar que até o momento não foram realizados estudos que visam a maximização da extração de fenólicos da casca comparando diferentes métodos de extração, nem com o foco para obtenção de um extrato com fitoesteróis. Neste sentido, há um amplo campo a ser explorado, incluindo a aplicação dos extratos de casca de pinhão em produtos alimentícios e cosméticos. ‘

TABELA 1 - PESQUISAS REALIZADAS COM A CASCA DE PINHÃO RELATADAS NA LITERATURA

(continua)				
Tipo	Método	Características/ Condições	Objetivo	Outras informações / Conclusões
Cozida e Seca	1	ECP aquoso, 1:100 S/S; T amb.; sob agitação.	Avaliar a estabilidade do pó de CP ao longo de 3 meses de armazenamento a 25 °C.	*O cozimento do pinhão facilitou a extração dos polifenóis e não afetou a atividade antioxidante (ABTS); *As CPs cozidas podem ser mantidas à 25°C por até 90 dias, com degradação mínima de fenólicos e compostos com atividade antioxidante, e baixo crescimento de bactérias viáveis a deterioração, embora o produto possa sofrer degradação devido ao crescimento de leveduras.
	2	ECP etanólico puro; hidroetanólico 80%; água de cozimento do pinhão (EAC); 1:24 S/S; T amb; sob agitação.	Obter e caracterizar ECP, aplica-los como fonte de polifenóis naturais em filmes de zeína.	*Identificação de 13 compostos fenólicos nos extratos. * A maior concentração foi obtida na extração hidroetanólica; * Melhores propriedades mecânicas foi com a (EAC).
Seca	-	ECP etanólico; Otimização: da razão S/S, concentração do solvente e temperatura.	Otimizar a extração de fenólicos da CP por Ultra-Turrax.	*A %S/S e %etanol tiveram efeitos positivos significativos ($p < 0,05$); *A temperatura teve um efeito negativo para fenólicos e positivo para o volume de extração. *A % etanol foi diretamente proporcional ao volume de produção. *ECP ricos em fenólicos: baixas temperaturas, maiores % etanol no solvente e maior sólidos na extração.
	3	EAC aquoso.	Caracterizar o ECP e incorporar em filmes com proteína isolada de soja (SPI) e avaliar suas características.	O ECP forneceu capacidade antioxidante aos filmes, coloração marrom escura e contribuiu para a estabilidade oxidativa do óleo de linhaça e, sendo possível usar em embalagem biodegradável ativa para óleos comestíveis.

(DE FREITAS et al., 2018)

(SANTOS et al., 2018)

(DE SOUZA et al., 2020)

TABELA 1 - PESQUISAS REALIZADAS COM A CASCA DE PINHÃO RELATADAS NA LITERATURA

(continua)

Seca	1	ECP com etanol, metanol, álcool isopropílico e água melhor: etanol; Volume de solvente, concentração de etanol e temperatura; Sob agitação 125 rpm.	Otimizar as condições de extração de compostos antioxidantes da CP por de extração por solvente.	As três variáveis otimizadas tiveram efeito significativo na extração de compostos fenólicos, mas a temperatura teve menor; *Para maior extração de compostos fenólicos: 1:12, 59% de etanol e 68 °C.	(CLADERA-OLIVEIRA et al., 2008)
	1	ECP hidroetanólico 70% etanol/água; 1:12 S/S; T ambiente; sob agitação a 140 rpm.	Investigar os possíveis efeitos de um ECP rico em taninos sobre α -amilases.	*O ECP rico em taninos condensáveis foi inibidor eficaz da inibição da α -amilase pancreática e salivar porcina e humana; *Eficaz na redução dos níveis glicêmicos pós-prandiais em ratos após a administração de amido; *As propriedades inibitórias do ECP indicam que ele pode ser usado para suprimir a hiperglicemia pós-prandial em pacientes diabéticos;	(SILVA et al., 2014)
Seca	1	ECP hidroetanólico 70% etanol/água; 1:12 S/S; T ambiente; sob agitação a 140 rpm.	Avaliar as hipóteses de que o ECP rico em taninos seria capaz de inibir a lipase pancreática ou mesmo outras lipases. E se o ECP devem ser igualmente capazes de afetar a absorção lipídica <i>in vivo</i> .	*Os taninos da CP é um inibidor eficaz da lipase pancreática; *Eficaz na diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos em camundongos após uma carga de azeite.	(OLIVEIRA et al., 2015)
	4	ECP e ESP metanólico; *Melhor para flavonoides e biflavonoides; 1:5 S/S; T ambiente; Extratos com a semente crua também.	Caracterizar e avaliar extratos alcoólicos obtidos a partir do pinhão e suas possíveis aplicações como antioxidantes em cosméticos, tentando valorizar ainda mais, sob ponto de vista funcional.	*Ambos os extratos metanólicos (ECP e ESP) apresentaram atividade antioxidante. ECP foi melhor e aplicado nas formulações cosméticas. *Foi avaliado as formulações cosméticas (emulsão água/óleo, emulsão óleo/ água e gel) com adição do extrato da casca (1%) seco, o melhor resultado de atividade antioxidante foi alcançado com a emulsão água/óleo, compatíveis com a eficácia na pele.	(MOTA et al., 2014)

TABELA 1 - PESQUISAS REALIZADAS COM A CASCA DE PINHÃO RELATADAS NA LITERATURA

				(conclusão)
Seca	3	*ECP aquoso; 15:100 S/S; 60 °C; sob agitação. Sob agitação 100 rpm.	Utilizar derivados do pinhão, amido e extrato da casca, como novos ingredientes naturais para o desenvolvimento de formulações cosméticas (gel e emulgel).	*A adição dos ECPs melhorou as propriedades das formulações básicas. Mantiveram seus aspectos físicos e comportamento reológico. *A adição dos ECP pode ser uma fonte de compostos fenólicos (flavonoides e taninos) com potencial de atividade antioxidante, porém precisam de mais estudos para afirmar tal atividade na pele humana. *A formulação de emulgel foi o melhor veículo para a adição de ECP.
Seca	-	Diferentes concentrações de CP em filmes; *0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%.	Desenvolver filmes comestíveis a base de farinha de pinhão com porcentagens de pó de CP para adicionar fibras e polifenóis com capacidade antioxidante.	*A adição do pó da CP melhorou a resistência dos filmes, o conteúdo fenólico e as fibras além da capacidade antioxidante. * A diferença nas propriedades em relação à quantidade de CP pode determinar o uso dos filmes. *O aumento da CP nos filmes, aumentou a espessura, porosidade, tornou os filmes mais ásperos e mais hidrofílicos.
Seca	3	ECP aquoso; 1:15 S/S; 50 °C; sob agitação. Sob agitação 200 rpm; Temperatura: 50 °C.	Encapsular o ECP (<i>Araucaria angustifolia</i>) pela técnica de electrospinning em fibras de amido e avaliar sua atividade antioxidante e liberação <i>in vitro</i> .	*O ECP teve alta quantidade de fenólicos, como o dímero de catequina/epicatequina e catequina. *As fibras de amido por electrospinning tiveram de 62 a 100% de eficiência. O aumento da concentração dos ECPs reduziu a sua eficiência, mas a atividade antioxidante foi igual para todas concentrações. A melhor concentração foi 0,5%, com maior eficiência de encapsulamento e menor % de liberação <i>in vitro</i> .

FONTE: A autora (2020).

Legenda: Cozida: Cocção em água fervente, remoção de umidade em estufa e moagem. Seca: Sem cocção em água fervente, apenas remoção de umidade em estufa e moagem. 1: Agitação magnética; 2: Ultraturrax; 3: Banho termostático; 4: Maceração e depois sonicator. CP: Casca de pinhão; ECP: Extrato de CP; EAC: Extrato da água de cozimento do pinhão; SP: Semente (porção comestível); ESP: Extrato de SP.

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

3.2.1 Antioxidantes

A oxidação lipídica nos alimentos ocorre devido aos lipídios serem suscetíveis a processos oxidativos na presença de catalisadores, como calor, luz, enzimas, metais, metaloproteínas e micro-organismos que desenvolvem sabores desagradáveis nos alimentos e resultam na perda de aminoácidos essenciais, vitaminas lipossolúveis e outras moléculas bioativas (SHAHIDI; ZHONG, 2005). Essa oxidação pode ocorrer durante a colheita, processamento e armazenamento de alimentos e causa deterioração química, como ranço e/ ou deterioração do valor nutricional, sensorial, podendo influenciar na cor, sabor, textura e segurança dos produtos alimentícios (YANISHLIEVA; MARINOVA, 2001; SHAHIDI; ZHONG, 2015; ATTA; MOHAMED; ABDELGAWAD, 2017).

A utilização de antioxidantes para redução da oxidação lipídica é o meio mais eficaz, conveniente e econômico. Os antioxidantes desempenham um papel importante na preservação dos alimentos, inibindo os processos de oxidação e contribuindo para a promoção da saúde proporcionada por muitos suplementos alimentares, nutracêuticos e ingredientes funcionais dos alimentos (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Eles também são usados em áreas relacionadas à saúde devido à sua capacidade de proteger o corpo contra danos oxidativos (SHAHIDI; ZHONG, 2007).

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes nos alimentos ou no corpo em concentrações muito baixas, atrasam, controlam ou impedem processos oxidativos que levam à deterioração da qualidade dos alimentos ou ao início e propagação de doenças degenerativas no corpo. Os antioxidantes que se enquadram nessa definição incluem sequestradores de radicais livres, inibidores de oxigênio singlete, inativadores de peróxidos e outras espécies reativas de oxigênio (ERO), quelantes de íons metálicos, inibidores de produtos de oxidação secundária, inibidores de enzimas pró-oxidativas, entre outros (SHAHIDI; ZHONG, 2007).

Os antioxidantes podem ocorrer naturalmente em plantas, animais e micro-organismos, ou podem ser sintetizados por meios químicos (SHAHIDI; AMAROWICZ, 1996; AMAROWICZ; KARAMAC; SHAHIDI, 1999; ATHUKORALA et al., 2003; SHAHIDI; ZHONG, 2007). Os antioxidantes de ocorrência natural podem ser isolados

de seu material de origem como compostos puros para possível uso em aplicações nutracêuticas/farmacêuticas. Alternativamente, extratos de plantas ou animais contendo um coquetel de substâncias antioxidantes com potenciais efeitos sinérgicos são usados diretamente para inibir a oxidação *in vitro* e *in vivo* (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

3.2.2 Compostos com propriedades antioxidantes

Os polifenóis, encontrados em frutas e vegetais são divididos em diversas classes, como ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, estilbenos e lignanas. E estes compostos contribuem para o efeito antioxidante de muitas espécies de frutos pequenos (CUEVAS-RODRÍGUEZ et al., 2010; DENARDIN et al., 2015).

Os polifenóis possuem alta atividade antioxidante *in vitro* e são capazes de eliminar uma ampla gama de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro, como ânion superóxido, radical hidroxil, radicais peroxil, ácido hipocloroso e ácido peroxinitroso. Eles também quelam íons metálicos e, portanto, diminuem sua atividade pró-oxidante (ANTOLOVICH et al., 2002; TABART et al., 2009; DENARDIN et al., 2015).

Os compostos fenólicos são substâncias que contêm anéis benzênicos associados a grupos hidroxila em sua estrutura. Podem ter como substituintes os grupos amino, monossacarídeos, metil e metoxil. Os compostos de maior interesse são os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonoides, cumarinas, ligninas, taninos e tocoferóis. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais para garantir sua proteção contra ferimentos, radiações ultravioletas e infecções, sendo encontrados aproximadamente cinco mil tipos de compostos fenólicos na natureza (QUIDEAU et al., 2011).

O potencial antioxidante é a bioatividade mais importante e amplamente estudada atribuída aos compostos fenólicos (DE CAMARGO et al., 2019). O grau de hidroxilação e a posição dos grupos hidroxila na molécula dos compostos fenólicos são fatores que determinam sua atividade antioxidante, portanto os polifenóis são, geralmente, mais eficazes que os monofenóis (OLDONI et al., 2016; DE CAMARGO et al., 2018). A solubilidade e os efeitos estéricos de cada molécula podem ser

afetados pelo tipo de estrutura, como no caso dos derivados glicosilados, que podem aumentar ou diminuir a atividade (LIMA, 2008).

A determinação dos compostos fenólicos em plantas e vegetais depende de vários fatores, principalmente a técnica de extração e o solvente de extração utilizado. Para obter uma extração completa dos produtos desejados, o solvente ideal deve ter seletividade máxima, compatibilidade com as propriedades dos materiais extraídos e as maiores capacidades de extração (PASSARI; SCARMINIO; BRUNS, 2014; TORMENA et al., 2019).

Devido as múltiplas características e mecanismos de reação, um único ensaio antioxidante não mensura com precisão todos os antioxidantes em um sistema misto ou complexo. Desse modo, o uso de diferentes ensaios antioxidantes ajudam a identificar variações nas respostas dos compostos extraídos das matrizes (ANTOLOVICH et al., 2002; TABART et al., 2009; DENARDIN et al., 2015). Os métodos de determinação do potencial antioxidante podem ser tanto *in vitro*, quanto os *in vivo*. Sendo encontrado alto grau de correlação entre a atividade antioxidante *in vitro* e o conteúdo fenólico total e/ou fenólicos individuais. A associação entre métodos antioxidantes *in vitro* e *in vivo* permanece discutível e a opinião de especialistas na área é dividida em relação à validade desses métodos *in vitro* (GRANATO et al., 2018).

Os compostos fenólicos totais podem apresentar característica antioxidante, determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Alternativamente, a capacidade antioxidante *in vitro* pode ser realizada por diferentes ensaios, como a título de exemplo pelo método do radical ABTS (ácido 2,2-azino-bis[3 etilbenzotiazolina]-6-sulfônico) (HUANG; OU; PRIOR, 2005), o sequestro dos radicais livres por composto 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2015) e pelo método de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Os métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC (método de capacidade de absorbância do radical de oxigênio) são considerados os métodos mais comuns utilizados para análise de antioxidante *in vitro* (GRANATO et al., 2018; HALLIWELL, 2012; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

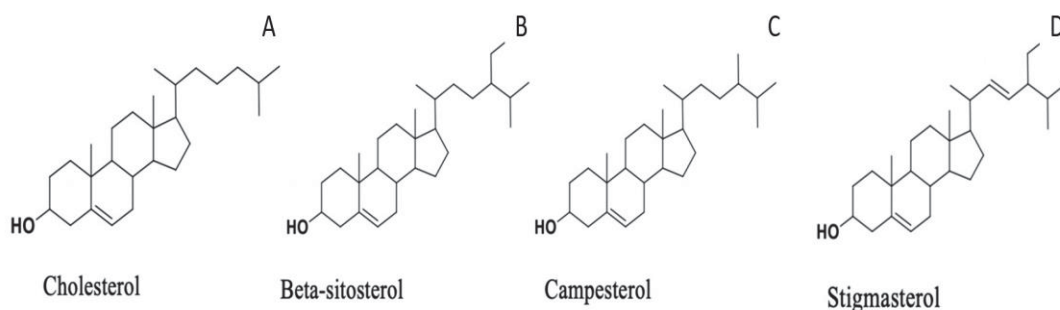
Os métodos *in vitro* (atividade fenólica e antioxidante) são ferramentas valiosas para estimar o impacto do processamento convencional e não convencional, e assim avaliar os processos de oxidação lipídica ou para extrair mais compostos antioxidantes de matérias-primas (CARBONELL-CAPELLA et al., 2016; HASHEMI et al., 2018; TOUATI et al., 2016; ZOU et al., 2017).

3.2.3 Fitoesteróis

Os fitoesteróis, também chamados de esteróis vegetais, são compostos naturais pertencentes à família dos triterpenos. São estruturalmente semelhantes ao colesterol, exceto pela presença de um grupo metil ou etil no átomo de carbono C-24 de sua cadeia lateral (Figura 3). Enquanto o colesterol é um componente fundamental das membranas celulares dos animais, os fitoesteróis desempenham importantes funções metabólicas nas células vegetais (MERAH; MOULOINGUI, 2019).

Os fitoesteróis são encontrados naturalmente em vegetais, e principalmente em sementes, óleos vegetais, cereais, nozes, legumes e frutas. Os mais comumente encontrados em alimentos são o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (PIIRONEN et al., 2000). O β -sitosterol é um dos fitoesteróis mais comuns e abundantes (MATSUOKA et al., 2008). É considerado um complemento nutricional seguro em alimentos com vários benefícios farmacológicos (BIN SAYEED et al., 2016).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS FITOESTERÓIS



FONTE: Adaptado de Tolve et al. (2020).

Colesterol (a) dos fitoesteróis β -sitosterol (b), campesterol (c) e estigmasterol (d).

Os fitoesteróis quando adicionados aos alimentos podem reduzir a absorção de colesterol no intestino e, assim, diminuir os níveis de colesterol no sangue (CANTRILL; KAWAMURA, 2008; ABUMWEIS et al., 2014), prevenção de doenças cardiovasculares (JONES et al., 1997) e desenvolvimento de câncer (SUTTIARPORN et al., 2015; KANGSAMAKSIN et al., 2017), pode ser útil na prevenção da aterosclerose (MEGURO et al., 2003) entre outros benefícios.

Os fitoesteróis também tem função de proteção de óleos vegetais contra a oxidação e polimerização durante o tratamento térmico, no seu processamento e

quando exposto à luz (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002), podem ser usados para caracterizar e autenticar óleos vegetais (LUKIĆ et al., 2013; XU et al., 2014, 2018) atuando como marcadores para avaliação de óleos adulterados (ABIDI, 2001). Os fitoesteróis e seus ésteres de ácidos graxos são compostos bastante estáveis (CANTRILL; KAWAMURA, 2008), apresentam solubilidade de 1 a 2% em água e de 3 a 4% em óleo gordura e óleo (SAKAMOTO; NAKAHARA; SHIBATA, 2013; YIN et al., 2018). Também podem ser extraídos e aplicados em produtos alimentícios como substitutos de gordura, para melhorar o sabor dos produtos alimentares e mascarar a amargura e, incorporados em uma variedade de alimentos, bebidas e suplementos (CANTRILL; KAWAMURA, 2008).

A incorporação dos fitoesteróis em leites e derivados tem sido avaliada para verificar seus efeitos sensoriais e propriedades físico-químicas (NAGARAJAPPA et al., 2018), sendo incorporados ao leite antes da pasteurização (IZADI et al., 2015), ou após a etapa de maturação e resfriamento, onde ocorre a mistura de ingredientes (polpa de fruta, essência e corante), ou ainda incorporando microcápsulas contendo fitoesteróis, óleo de echium e ácido sinápico, ou na forma livres (COMUNIAN et al., 2017).

A extração por Soxhlet é a técnica mais utilizada para a obtenção de fitoesteróis em escala laboratorial, que envolve o uso de solventes orgânicos, como n-hexano, éter de petróleo, etanol e diclorometano. Entretanto, há métodos alternativos, como extração com CO₂ supercrítico e extração assistida por ultrassom, também eficazes na recuperação desses compostos bioativos (UDDIN et al., 2015, 2018). Há ainda também outros métodos menos comuns, como a extração por decocção, infusão, turbólise com ultra-turrax, maceração (OLIVEIRA et al., 2016).

3.3 IOGURTE

Segundo a Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007, o iogurte, também chamado de Yogur ou Yoghurt é o produto cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto (BRASIL, 2007).

Para ser designado iogurte, o produto precisa atingir alguns padrões pré-estabelecidos pela IN 46 (BRASIL, 2007), tais como ter o mínimo de proteínas de 2,9 g/100g de produto, estar com acidez entre 0,6 e 1,5 g de ácido láctico/100 g de iogurte, ter no mínimo contagem de bactérias lácticas totais de 10^7 (UFC/g). Além de ser possível adicionar amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de 1% (m/m) do produto. Ainda, os ingredientes opcionais não-lácteos, isoladamente ou combinados deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto. Em relação aos aditivos, em especial os corantes, há variações de 50 mg a 500 mg/kg, tal como para os Beta-caroteno (sintético idêntico ao natural) e carotenoides, extratos naturais: Beta-caroteno, o máximo permitido é 50 mg/kg. Enquanto o caramelo IV processo sulfito - amônia, caramelo III-processo amônia é 500 mg/kg. Há ainda classificações em relação aos valores de gordura, aditivos para rotulagem, entre outras observações.

O iogurte é um alimento lácteo bem conhecido produzido pela fermentação do leite com bactérias do ácido láctico (LAB). Como os peptídeos bioativos são produzidos pelo LAB durante a fermentação do iogurte, o iogurte tem maior atividade biológica que o leite (PESSIONE; CIRRINCIONE, 2016). Especificamente, alguns peptídeos no iogurte têm atividades antioxidantes, como inibição da peroxidação lipídica e remoção de radicais (NIELSEN et al., 2017; SAH et al., 2014).

Sabe-se que o consumo de alimentos saudáveis apoia estilos de vida saudáveis e reduz o risco de doenças (ASIOLI et al., 2017). Nesse sentido, o consumidor está procurando cada vez mais consumir alimentos mais saudáveis e essa demanda levaram a indústria de alimentos a desenvolver produtos funcionais com efeitos benéficos à saúde (VECCHIO; VAN LOO; ANNUNZIATA, 2016).

O desenvolvimento de iogurte mais nutritivo é um tópico em andamento na ciência dos laticínios, Tomic (2017) elaboraram iogurtes sem açúcar e com a gordura, reduzida, fortificados com fibras alimentares insolúveis (1,5 e 3%) de tritcale, aveia ou trigo. Entre as três matérias-primas utilizadas, houve maior preferência para os iogurtes fortificados com tritcale. Dessa forma, a fibra alimentar insolúvel desta matéria-prima mostrou que é um potencial promissor para ser usada como ingrediente fortificante na produção de produtos lácteos fermentados enriquecidos com fibra, como iogurte.

A adição de fibras insolúveis nos iogurtes pode promover sensação arenosa na boca. Isso tem sido atribuído não apenas a quantidade ou tamanho de partículas

de fibra, mas também ao formato das fibras, como observado por Espírito-Santo et al. (2013) na realização de testes de aceitação do consumidor de iogurte fortificado com fibra de maracujá, em que suas partículas apresentavam bordas como “pedras” e eram capazes de sensibilizar a boca mais do que se eles tivessem um esférico e forma suave.

Hashim et al. (2009) fortificaram iogurte com fibra de tâmaras em 1,5, 3,0 e 4,5%. A fortificação 3% de fibra de tâmara apresentou índices de acidez, doçura, firmeza, suavidade e aceitação geral semelhantes aos do iogurte de controle, sendo a formulação em níveis aceitáveis e com efeitos benéficos à saúde. Enquanto o aumento da concentração diminuiu a aceitação e seus atributos sensoriais. Hoppert et al. (2013) relataram que quando o enriquecimento de fibras por meio de cereais é desejada, deve ser colocado ênfase especial no tamanho das partículas que são incorporadas no iogurte com fibra visível, o tamanho da massa incorporada fibra, é o principal fator a ser considerado na otimização do produto. No Brasil, para um alimento ser fonte de fibra, em 100 mL de líquido é necessário ter no mínimo 1,5 g de fibras, enquanto que para ser alto em fibras precisa ter 3 g.

A incorporação do pinhão em produtos lácteos ainda não foi estudada, nesse sentido, avaliar o comportamento tanto da contribuição do extrato da casca do pinhão, bem como investigar qual etapa e concentração de semente adicionar ao iogurte torna-se necessário. Desse modo, é uma alternativa a mais de produto com o pinhão com alto valor nutricional, uma vez que a semente irá incorporar fibras alimentares, amido resistente que apresenta função prebiótica, minerais e ainda potencializar a ação antioxidante ao adicionar o extrato da casca do pinhão. Dessa forma isso aumenta a sua valorização, incentiva novas plantações e cooperativas.

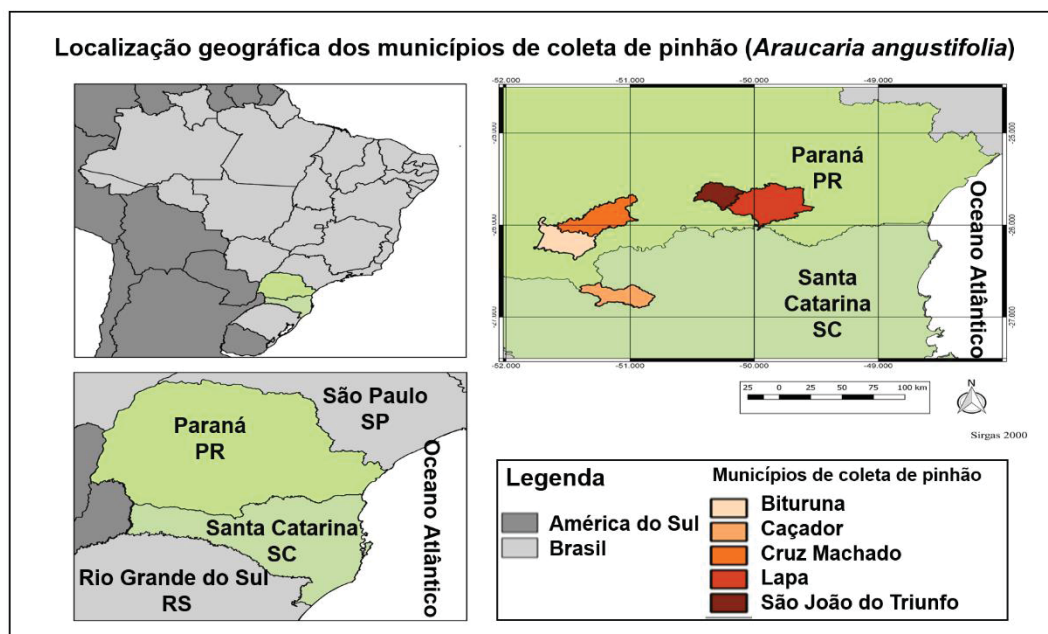
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

3.1.1 Obtenção dos pinhões para avaliar o efeito da origem na composição nutricional da semente

As amostras de pinhão foram coletadas em junho de 2019, nos municípios: Bituruna (BIT): latitude: 26° 09' 41" S, longitude: 51° 33' 09" W; Caçador (CAÇ): latitude: 26° 46' 31" S, longitude: 51° 00' 54" W; Cruz Machado (CM): latitude: 26° 01' 03" S, longitude: 51° 20' 48" W; Lapa (LAP): 25° 46' 11" S, longitude: 49° 42' 57" W, e São João do Triunfo (SJT): latitude: 25° 41' 00" S, longitude: 50° 17' 50" W).

FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS MUNICÍPIOS DE COLETA DO PINHÃO DO ESTUDO



Fonte: A autora (2022).

Municípios: Bituruna/PR, Caçador/SC, Cruz Machado/PR, Lapa/PR e São João do Triunfo/PR.

Os pinhões foram escolhidos de cinco locais para ter uma coleção regionalmente bem distribuída, uma vez que a flora de *A. angustifolia* abrange uma grande área no estado do Paraná e na porção norte do estado de Santa Catarina (CARVALHO, 1994). As imagens foram elaboradas com o software Quantum Gis 2.18.9 (Figura 4). As amostras de pinhão coletadas em cada local foram colhidas

aleatoriamente de dez árvores, representando um quilo no total, e posteriormente armazenadas em sacos de polietileno e levadas para o laboratório para a realização de análises.

3.1.2 Obtenção dos pinhões para avaliar a casca, seus extratos e elaboração do iogurte

As amostras de pinhão para a obtenção dos extratos foram coletadas em maio de 2020, na Unidade da Embrapa Florestas, Colombo/PR (latitude: 7° 0' 37" S, longitude: 37° 20' 14" W) de 10 árvores, de pontos distintos. Os pinhões para elaboração dos iogurtes foram obtidos do mesmo local, em junho de 2021.

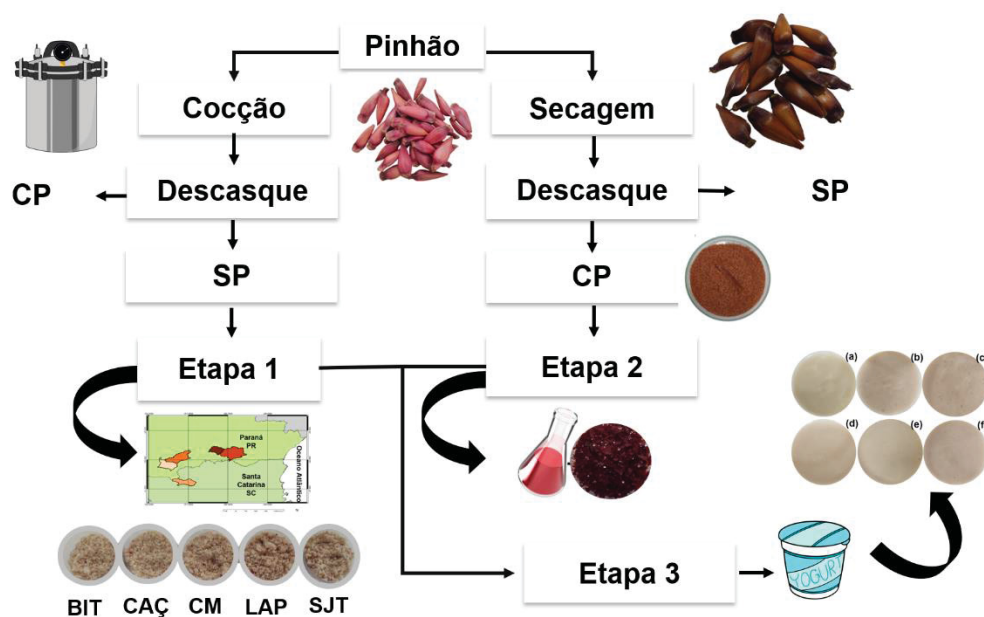
3.2 ESCOPO DO TRABALHO

As etapas do presente trabalho podem ser observadas na Figura 5. A primeira etapa (Item 4.1) consistiu em avaliar a composição nutricional, mineral, cor, ingestão dietética recomendada das sementes do pinhão e correlacionou com as variáveis ambientais como temperatura, precipitação e altitude. Para isso, a análise de componentes principais e análise de cluster foram incluídos para avaliar as correlações. Essa etapa subsidiou o conteúdo do primeiro artigo intitulado "*Linking geographical origin with nutritional, mineral, and visual proprieties of pinhão (Araucaria angustifolia seed) from the south of Brasil*", publicado na *Journal of Food Science*.

A segunda etapa (Item 4.2) abordou as avaliações correlacionadas a casca de pinhão. Nesta etapa os métodos de extração de compostos fenólicos da casca por Infusão e agitação orbital em Shaker foram avaliadas. As condições maximizadas por Infusão e Shaker foram comparadas com o método tradicional por Soxhlet em relação aos fenólicos, atividades antioxidantes, flavonoides, taninos condensados e fitoesteróis. Além de avaliar a toxicidade dos extratos e determinar qual concentração que atinja 50% de letalidade (LC50) frente ao ensaio por *Artemias salinas*. Os compostos responsáveis pelas atividades antioxidantes, bem como os fitoesteróis da casca utilizada na extração foram avaliados por cromatografia gasosa. O extrato bioativo da casca do pinhão, escolhido a partir desses resultados, pelo método de extração por Shaker foi aplicado em iogurte natural após a fermentação. Os iogurtes *in natura* padrão e adicionado de extrato foram submetidos a digestão gastrointestinal

simulada, a fim de verificar a contribuição da adição do extrato no iogurte em relação aos fenólicos, flavonoides e o potencial antioxidante pelos métodos (ABTS, DPPH, FRAP). Essa etapa subsidiou o conteúdo do primeiro artigo intitulado “*Enhancing the health benefits of yogurt with pinhão seed coat extract: optimization of extraction methods and in vitro bioaccessibility*”, publicado na *Journal of Food and Nutrition Research*.

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO PROJETO



FONTE: A autora (2022).

SP: Semente de pinhão; CP: Casca de pinhão; ECP: Extrato de CP; BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo. Iogurtes: (A) SP₀, (B) SP5 Depois, (C) SP10 Depois, (D) SP₀ + ECP, (E) SP5 Antes, (F) SP10 Antes.

A terceira etapa (Item 4.3) consistiu na aplicação da semente e o extrato em iogurte. Neste sentido, elaborou-se formulações contendo 0, 5 e 10% de semente cozida, triturada e peneirada. Sendo que em 5 e 10% de semente foi investigado o processo de adição da semente antes ou depois da fermentação. Após o iogurte pronto, foi adicionado o extrato em todas as formulações, e um iogurte somente com extrato também foi elaborado para comparação da cor. Foi investigado a influência da adição da semente na cinética de fermentação, a composição centesimal, minerais, digestibilidade de proteínas e compostos fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante por ABTS, DPPH e FRAP, após digestão gastrointestinal *in vitro*. E ainda, avaliou-se a sua estabilidade no período de vida útil. Nos tempos 0, 7 e 30 dias foram

avaliados a cor, pH, acidez, em 0 e 30 dias a capacidade de retenção de água, viscosidade e composição química por Ressonância Magnética Nuclear, e em 30 dias a sinérese espontânea.

3.3 PREPARO DOS PINHÕES

3.3.1 Preparo para avaliação do efeito da origem na composição nutricional e aplicação em iogurte

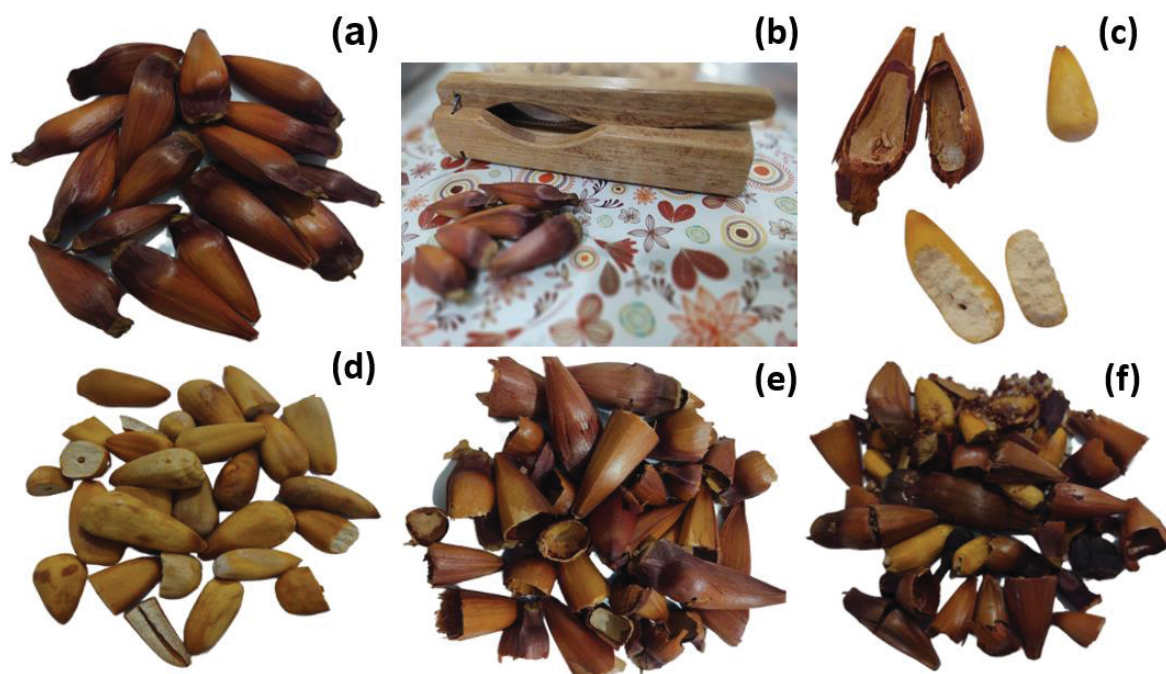
As amostras de pinhão de cada região (~1 kg) foram cozidas individualmente por 30 min a 121°C (1 atm) em autoclave vertical modelo 103 (FabbeCenter, São Paulo, Brasil). As sementes (porção comestível) foram removidas manualmente com um removedor de casca de madeira. Posteriormente foram trituradas por 1 min em um moedor e após peneiradas em peneira (Bertel, Caieiras, Brasil) de 35 Mesh, adquirindo tamanho de partícula menor que 425 µm. Em seguida, foram acondicionados em frascos de polipropileno contendo 100 g de amostra de pinhão e congelados em freezer vertical Re 26 (Eletrolux, Curitiba, Brasil) a -20,0 °C até o momento das análises.

3.3.2 Preparo para avaliar a casca e seus extratos

Esta etapa do trabalho utilizou-se o pinhão seco para que pudesse aproveitar a maior quantidade de compostos fenólicos na casca, sem ocorrer a migração para a porção comestível do pinhão e a água de cozimento através do cozimento por imersão. Ainda, para que se tivesse uma alternativa de conservação do pinhão com menor custo, uma vez que normalmente o pinhão é congelado.

O procedimento foi da seguinte forma: após a coleta, os pinhões foram selecionados, limpos e secos em estufa com circulação de ar, à 60°C, por 48 h (SANT'ANNA et al., 2016). Os pinhões apresentaram umidade residual de 7,54% (AOAC, 2016) foram acondicionados equitativamente em cinco sacos de polietileno. O pinhão seco foi descascado (Figura 6, B) e suas cascas foram trituradas em moinho de facas tipo *Willie STAR FT-60 Macro*, com peneira de 20 Mesh (Fortinox, Piracicaba, Brasil). O rendimento das sementes, cascas e rejeitos (Figura 6 D, E e F) após o descasque foi calculado. Assim como o rendimento de moagem da casca.

FIGURA 6 – OBTENÇÃO DAS CASCAS DO PINHÃO PARA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS



FONTE: A autora (2020).

Pinhão *in natura* (a); pinhão pós-secagem em estufa e descasque (b); processos de separação do pinhão: remoção da casca (c); semente (d); casca (e) e rejeito (f).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE PARTÍCULAS DA CASCA DE PINHÃO APÓS MOAGEM

Mesh	Abertura (μm)	Dm (μm)
12	1400	>1400
14	1180	1290
24	710	945
35	425	567
48	300	362
100	150	225
Fundo	<100	75

FONTE: A autora (2021).

Mesh: número de abertura por polegada; Abertura: tamanho que a partícula passa da peneira; Dm: diâmetro médio.

A distribuição das partículas foi realizada (50 g de amostra, em quintuplicata) por peneiramento manual ou em agitador granulométrico (Bertel, Caieiras, Brasil) por 10 min com uso das peneiras (Bertel, Caieiras, SP, BR) de 12, 14, 24, 35, 48, 100 Mesh e fundo. As frações foram pesadas e acondicionadas em sacos de polietileno com porções de 100 g cada (Tabela 2).

3.4 PREPARO DOS EXTRATOS BIOATIVOS DA CASCA DE PINHÃO

A amplitude dos parâmetros de processo seguiu os parâmetros determinados em estudos anteriores que realizaram a obtenção de extrato de casca de pinhão e de outros vegetais (DE FREITAS et al., 2018; SANTOS et al., 2018) e outros vegetais (OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2020), além de experimentos preliminares com os tamanhos de partícula escolhidos, volume de extrato, faixa de temperatura do equipamento, entre outros fatores. O etanol 99,5% (Anidrol) foi o solvente utilizado para extrair os compostos fitoesteróis (apolar) da CP (LIMA et al., 2020) e viabilizar sua aplicação em alimentos ou produtos cosméticos (ANVISA, 2019).

3.4.1 Extração por Infusão

As extrações por Infusão seguiram um delineamento experimental de dois níveis para três fatores (2^3), com três repetições no ponto central para avaliar o efeito da granulometria (G), proporção de sólido em relação ao solvente (%S/S) e tempo (t) sobre a quantidade de fenólicos totais (Tabela 3).

TABELA 3 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO POR INFUSÃO.

Níveis	G (μm)*	S/S (%m/v)	t (min)
-1	225	4,17	5,0
0	362	8,33	17,5
+1	567	12,50	30,0

FONTE: A autora (2021).

*G: Granulometria em diâmetro médio; S/S: porcentagem sólido em relação ao solvente; t: tempo de extração.

A extração por Infusão ocorreu vertendo-se 10 mL de etanol, previamente aquecido até ebulição do solvente (78,3 °C) em Erlenmeyer. Na qual havia uma quantidade de casca de 0,417 g a 1,25 g, dependendo do ensaio. O procedimento ocorreu na ausência de luz, sendo incubado até tempo previsto de extração, acordo com o planejamento experimental (OLIVEIRA et al., 2016).

3.4.2 Extração por agitação orbital em equipamento tipo Shaker

As extrações por Shaker foram realizadas com dois níveis para os quatro fatores (2⁴) com três repetições no ponto central para avaliar o efeito da granulometria (G), proporção de sólido em relação ao solvente (%S/S), tempo (t) e temperatura (T) sobre a quantidade de fenólicos totais (Tabela 4).

TABELA 4 - PARÂMETROS UTILIZADOS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO POR SHAKER

Níveis	G (µm)*	S/S (%m/v)	t (min)	T (°C)
-1	225	4,17	15	25,0
0	362	8,33	30	37,5
+1	567	12,50	45	50,0

FONTE: A autora (2021).

*G, granulometria em diâmetro médio; S/S, porcentagem sólido em relação ao solvente; t, tempo de extração; T, temperatura de extração.

A extração por Shaker ocorreu adicionando 10 mL de etanol a casca do pinhão seca (0,417 g a 1,25 g) contida em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Cada Erlenmeyer foi vedado com plástico filme e submetido a agitação (140 rpm) em incubadora Shaker orbital TE-42I (Tecnal, Piracicaba, Brasil) com temperatura e tempo controlados (SILVA et al., 2014) de acordo com o planejamento experimental, na ausência de luz.

3.4.3 Recuperação e rendimento do extrato por Infusão e Shaker

Após o tempo de extração de Infusão e Shaker, o extrato líquido foi separado das cascas com auxílio de pipeta de *Pasteur* e subdivido em Eppendorf (2 mL) para centrifugação a 15 °C em Centrifuga Heraeus Fresco 21 (Thermo Scientific®, Waltham, Mas, USA) a 10000 g por 5 min. Os sobrenadantes (extrato) foram transferidos para uma proveta de 10 mL para estimar o rendimento dos extratos conforme (SANTOS et al., 2018) com modificações (Equação 1). Onde R: Rendimento dos extratos (%v/v); Ve: Volume de extrato obtido; Vs: Volume do solvente inicial. Após, o extrato foi adicionado em novos microtubos para congelamento a -18 °C em freezer vertical CVU18GB (Consul, São Paulo, Brasil).

$$R (\%v/v) = (V_e/V_s) * 100 \quad (1)$$

3.4.4 Extração por Soxhlet

A extração com uso do método convencional por Soxhlet foi realizada em duplicata e utilizada para comparação entre os métodos maximizados por Infusão e Shaker. Para isso, utilizou-se 8,34 g de casca do pinhão com tamanho de partícula de médio de 225 µm, e proporção de sólido em relação ao solvente de 4,17% (melhores condições encontradas nos métodos maximizados). A casca foi adicionada em cartucho de filtro de papel e incluída no equipamento de Soxhlet, com 200 mL de etanol, por 6 h de extração (SANTOS et al., 2020). Após, o volume foi quantificado (sem centrifugação), seu rendimento calculado e congelado conforme descrito nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

3.4.5 Obtenção dos extratos em pó

Os três extratos bioativos da casca de pinhão obtidos pelos métodos de Infusão, Shaker e Soxhlet foram secos e utilizados para as análises de fitoesteróis totais, cromatografia gasosa, toxicidade e aplicação em iogurte. Para isso, o solvente (etanol) do extrato foi evaporado a 40 °C com vácuo de 600 mmHg em Evaporador Rotativo à Vácuo MA120/THV (Marconi, Piracicaba, Brasil). Posteriormente, o extrato em pó foi congelado em freezer doméstico a -18 °C. O rendimento de obtenção do pó foi calculado (Equação 2), onde R: Rendimento dos extratos (%m/m); mf: massa de extrato final em pó; mi: massa do extrato líquido inicial. Após, o extrato foi adicionado em novos microtubos para congelamento a -18 °C em freezer vertical CVU18GB (Consul, São Paulo, Brasil).

$$R (\%m/m) = (mf/mi) * 100 \quad (2)$$

3.5 ELABORAÇÃO DOS IOGURTES

A elaboração do iogurte para aplicação exclusiva do extrato (Item 4.2) ou aplicação de semente + extrato (Item 4.3) foram preparados conforme descrito a seguir:

A preparação utilizou o leite bovino pasteurizado da marca Tirol (Treze Tílias, Brasil) contendo 4,65% de carboidratos, 3,2% de proteínas e 3% de lipídios, bem como leite em pó desnatado da marca Molico (Araçatuba, Brasil), que contém 50% de carboidratos, 32,5% de proteínas e 0% de lipídios. Ambos os leites foram adquiridos em comércio local, na cidade de Curitiba/PR. Para a fermentação utilizou-se a cultura termofílica para iogurte Yoflex (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, YF-L812, Chr Hansen, Hørsholm, Dinamarca). O preparo da cultura foi realizado homogeneizando o pacote e pesando-se 0,1936 g de fermento para 10 mL de iogurte. Esta massa foi adicionada em 1 L de leite de previamente fervido e refrigerado, homogeneizou-se com bastão de vidro e depois fracionado em partes iguais (10 mL) em tubos Falcon, para conter quantidade equivalente para produzir 1 L de iogurte. Após foram congelados até seu uso.

Os iogurtes foram produzidos com 4 L de leite, tratados termicamente (85 °C, 8,5 min), conforme o esquema a seguir (Figura 7). O leite levou 10 min para atingir a temperatura do processo. E logo após, o leite foi resfriado até temperatura menor que 65 °C (para evitar a gelatinização do amido de pinhão) e ¼ do leite foi adicionado ao homogeneizador de bancada Arno Power Mix LQ10, 550 W (São Paulo, Brasil) juntamente com 2% de leite em pó desnatado, por 5 min. Em seguida, a mistura foi homogeneizada manualmente com o restante do leite (¾) e ao atingir 42 °C, a cultura termofílica para iogurte Yoflex foi adicionada ao leite, em concentração de 10^7 UFC/mL de cultura. Posteriormente, foram fracionados em 4 frascos esterilizados (~900 g): 2 para o iogurte padrão e 2 para adição de extrato após a fermentação. A incubação foi realizada a 42 ± 1 °C em estufa de cultura bacteriológica Q316 m (QUIMIS®, Brasil). O procedimento foi interrompido após o atingir o pH 4,6.

A fermentação foi avaliada em triplicata, conforme Tribst et al. (2018), medindo o declínio do pH em intervalos de 45 min (até 1 h e 30 min), intervalos de 30 min (até 5 h) e a cada 10 min até o iogurte atingir pH 4,6, com coletas de amostras em cada tempo. A equação de De Brabandere e Baerdemaeker (1999) para o declínio do pH em processos de fermentação foi usada para modelar os resultados obtidos

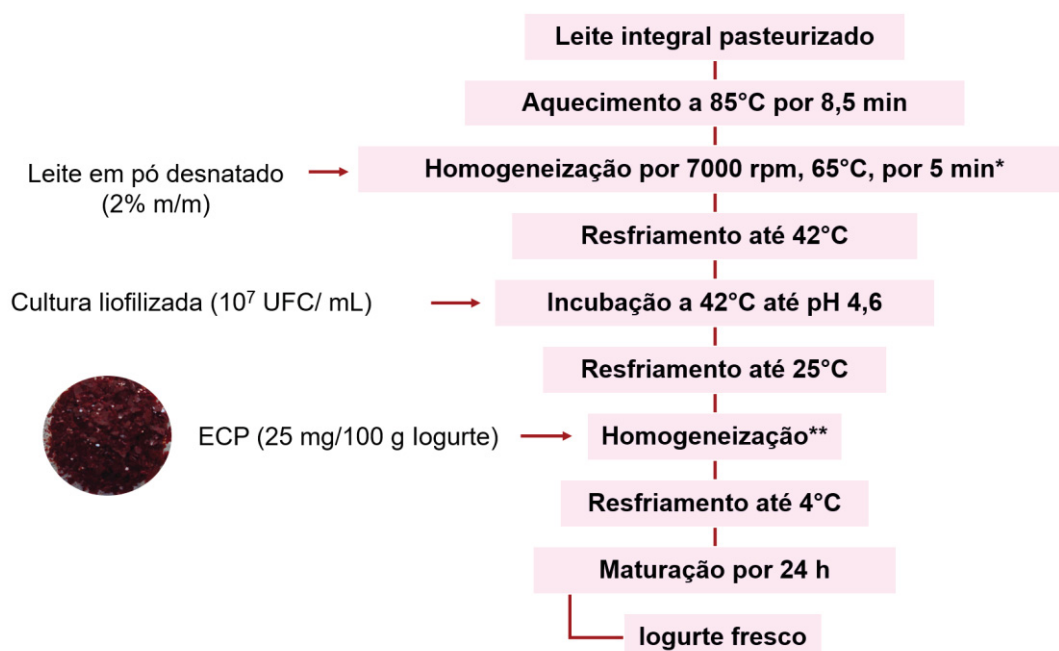
(Equação 3). Onde pH_0 : pH inicial; pH_∞ : pH final; μ : taxa de diminuição máxima de pH (h^{-1}); λ : tempo de atraso máximo (h); e : número de Euler, t tempo (h).

$$pH = pH_0 + (pH_\infty - pH_0) \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu e}{(pH_0 - pH_\infty)} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Após a fermentação, os iogurtes foram refrigerados a 25 °C, e então ocorreu a homogeneização manualmente: 30 voltas no sentido horário e 30 voltas no sentido anti-horário com ou sem a adição do extrato em pó em 25 mg/100g (quantidade segura e previamente definida). A diluição do extrato ocorreu com 1 mL do próprio iogurte.

Em seguida, o conteúdo foi envasado em potes de polipropileno de 200 mL (diâmetro superior de 55 mm, diâmetro inferior de 50 mm e 60 mm de altura), contendo ~ 100 g de amostra. Posteriormente as amostras de iogurte foram refrigeradas 5 ± 1 °C e deixadas descansar durante um período de 12 h (*overnight*).

FIGURA 7 - OBTENÇÃO DOS IOGURTES COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE CASCA (ECP) E SEMENTE DE PINHÃO



FONTE: A autora (2020).

*Adição de semente de pinhão cozido e triturado antes da fermentação. ** Adição de semente de pinhão cozido e triturado depois da fermentação.

Para a investigação do impacto da adição da semente na estabilidade do iogurte, bem como sua digestibilidade (Item 4.3), realizou-se dois tratamentos na adição da semente: i: Antes (*) e ii: Depois da fermentação (**). Além nas concentrações de semente de 0, 5 e 10%, em base úmida, em cada tratamento.

As amostras foram fracionadas em: iogurte padrão: P₀; e as adicionadas de extrato e semente cozida antes da fermentação: P₅ Antes e P₁₀ Antes; e adicionado semente depois: P₅ Depois P₁₀ Depois. Após o *overnight*, foram avaliadas nos tempos 0, 7 e 30 dias.

3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.6.1 Caracterizações

3.6.1.1 Composição centesimal

As análises foram realizadas nas sementes e nos iogurtes de acordo com a *Association Of Official Analytical Chemistry - AOAC* (2016), em triplicata exceto os lipídios, as fibras alimentares, o amido total e amido resistente, em duplicata. A umidade foi determinada pela perda de massa por secagem em estufa à 105 °C até massa constante (método n° 925.10). As cinzas (resíduo mineral fixo) pela massa residual depois de calcinação em mufla à 550 °C por 4 h (método n° 923.03). As proteínas pelo método Micro-Kjeldahl (método n° 991.20) utilizando-se o fator de conversão 6,25 para o pinhão e 6,38 para os iogurtes. Os lipídios por extração com éter etílico em Soxhlet por evaporação do solvente, por 2 h e massa residual da matéria extraída (método n° 920.39, C).

As fibras alimentares (total, insolúvel e solúvel) foram determinadas pelo método enzimático-gravimétrico [(método n° 32-05.01; AACC, 2009) e método n° 985.29; AOAC, 2005)]. A digestão enzimática foi realizada com três enzimas (α -amilase termostável, protease e amiloglucosidase) do kit comercial de fibra alimentar total (*Total Dietary Fiber*) (Megazyme International, Wicklow, Irlanda).

Os conteúdos de amido total e amido resistente foram determinados pela metodologia enzimática usando o kit comercial K-TSTA e K-RSTAR (Megazyme International, Wicklow, Irlanda), respectivamente. Os carboidratos totais (%) foram

calculados pela subtração de 100 menos a soma dos valores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibras alimentares.

3.6.1.2 Minerais

As análises de minerais foram realizadas nas sementes e iogurtes, em triplicata. O potássio (K) foi determinado com o uso de um fotômetro de chama (Quimis, Q398M2, Brasil) (SILVA, 1999). O fósforo (P) foi determinado por espectrofotometria no espectrofotômetro UV/VIS da região do visível (Perkin Elmer, Lambda 20, Inglaterra). Os conteúdos de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) foram determinados usando um espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, AA200, Inglaterra) (AOAC, 2016).

3.6.1.3 Valor nutricional

O valor calórico total (VCT) foi estimado pela soma dos produtos dos valores de proteínas, lipídios e carboidratos por g (16,72 kJ [4 kcal], 37,62 kJ [9 kcal] e 16,72 kJ [4 kcal], respectivamente) e suas respectivas unidades de índice energético em base seca. A Ingestão Dietética Recomendada (RDA) é o nível de ingestão alimentar diária suficiente para atender às necessidades nutricionais de indivíduos saudáveis em um determinado grupo de gênero e fase da vida. A RDA foi utilizada para prever as demandas estimadas dos componentes inorgânicos e proteínas (IOM, 2006; WHO, 2012; WHO/FAO, 2004). As porções usadas de semente de pinhão foram de 100 g, quantidade geralmente consumida pela população. Esse valor corresponde a 55 g em base seca, considerando 45% de umidade (BARBOSA et al., 2019; CORDENUNSI et al., 2004; SCHVEITZER et al., 2014).

3.6.1.4 Análise dos componentes colorimétricos $L^* a^* b^*$

A análise de cor das sementes, extratos líquidos e iogurtes foram realizadas por meio de um colorímetro digital MiniScan XE Plus (HunterLab, Reston, VA, EUA), no sistema CIE $L^* a^* b^*$, com a coordenada L^* (brilho: 0 = preto; 100 = branco), a^* (intensidade de vermelho/verde: $+a^*$ = grau de vermelho; $-a^*$ = grau de verde), b^* (intensidade de amarelo/azul: $+b^*$ = grau de amarelo; $-b^*$ = grau de azul), com

iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. Para o teste, ~3 g de amostra foram colocados em uma placa de acrílico com 4 cm de diâmetro e espessura de amostra de 5 mm (MALTA et al., 2021). As leituras foram plotadas usando o pacote R “colorspace”.

A Equação 4 apresenta a variação de cor (ΔE), calculada a partir dos valores de L^* (luminosidade), a^* e b^* (cromaticidade). Δ é a diferença entre cada parâmetro de cor da amostra de controle e a amostra de teste. Estes ensaios foram realizados em triplicata. Onde L_0^* , a_0^* e b_0^* são parâmetros da amostra de controle em cada caso (localidade) e L^* , a^* e b^* são parâmetros da amostra de teste.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (4)$$

A Cromacidade (C^*) foi avaliada de acordo com a Equação 5. O valor de croma (C^*) indica a saturação da cor, quanto maior o valor de $C^*a^*b^*$, mais saturada é a cor. Onde a^* e b^* : parâmetros da amostra em análise.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (5)$$

Foi calculado também o ângulo de tonalidade H° , através da Equação 6. O ângulo de tonalidade H° inicia-se no eixo $+a^*$ e é dado em graus; 0 seria $+a^*$ (vermelho), 90 seria $+b^*$ (amarelo), 180 seria $-a^*$ (verde) e 270 seria $-b^*$ (azul). Onde a^* e b^* : parâmetros da amostra em análise e atan é o arco tangente.

$$H^\circ = \text{atan} \frac{b^*}{a^*} \quad (6)$$

3.6.2 Análise dos compostos bioativos

3.6.2.1 Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas

Os compostos bioativos hidrofílicos e lipofílicos da casca foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (LIMA et al., 2020). As amostras de casca de pinhão (40 mg) contidas em Eppendorf de 1,5 mL foram adicionadas de 30 μ L de ácido nonadecanóico (2 mg/mL) para fase apolar e 30 μ L de

^{13}C - sorbitol (0,2 mg/mL) para fase polar. Adicionou-se 1,2 mL de etanol:tolueno 1:1 e misturados em vórtex. Posteriormente foram homogeneizados em Thermomixer a 70 °C e 950 rpm durante 15 min. Após 1 min em Thermomix, os Eppendorfes foram abertos para igualar a pressão momentaneamente, fechada novamente e agitados por 14 min. Após este período, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e centrifugadas por 7 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi recolhido, e adicionado em frascos de vidro de 5 mL. Sendo adicionado 1,2 mL de etanol:tolueno e repetida a centrifugação.

Para os extratos, adicionou-se amostras contendo 100 μL de extrato (ressuspendidos em etanol, para conter 10 mg/mL de amostra) e 2,4 mL de etanol:tolueno, em seguida o restante dos passos a seguir: Foi adicionado 400 μL de água ultrapura, agitou-se em vórtex, e centrifugou novamente a 5 min, a 1000 rpm. A fase apolar foi transferida para um novo tubo de 5 mL. Foi adicionado 0,5 mL de tolueno puro ao tubo contendo fase polar, agitado e centrifugado, e transferido o sobrenadante para o frasco novo, juntando com a fração anterior. Posteriormente foi a amostra foi seca com gás nitrogênio, e congelada -80°C. O que ficou no Eppendorf, foi dividido pela metade em dois Eppendorfes, e seco com tampa aberta em *Speed Vac*, modo V-AQ sem aquecimento por 10 horas e congelada -80°C.

Para a reação de metoximação, 50 μL de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg /mL) foram adicionados e incubados no Dry Block -Digestor/Termo reator para Desagregação de Amostras MA4004 (Marconi, Piracicaba, Brasil) a 30 °C por 90 min. Para a sililação, 50 μL de MSTFA foram adicionados e incubado no bloco de aquecimento a 37° C por 90 min e BSTFA, 70 μL durante 30 min a 37°C).

Após a derivatização, amostras que continham os compostos hidrofílicos e lipofílicos foram cromatografadas em sistema acoplado a um espectrômetro de massas com split de 1:25 e condução por hélio a 1,5 mL/min. O CG continha coluna DB-5 (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm) operada a 250 °C e a temperatura do injetor era de 230 °C, linha de transferência. O GC foi programado para 70 °C por 1 min, aquecimento a 320 °C a uma taxa de 8 °C/min e manutenção isotérmica por 5 min. O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV a 200 °C.

Os compostos foram identificados por meio do software AMDIS usando a coleção de referência do Golm Metabolome Database 24 para hidrofílicos compostos

e uma biblioteca construída no software AMDIS com amostras analisadas na Embrapa Florestas/Colombo/PR para casca (LIMA et al., 2020).

3.6.2.2 Compostos fenólicos totais

A análise de compostos fenólicos totais dos extratos de casca de pinhão foi determinada pelo método da capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton e Rossi (1965) com modificações, em triplicata. Uma mistura de 20 µL de extrato (1:10, v/v em água destilada) e 1,68 mL de água destilada foram misturados e homogeneizados em vórtex modelo 772 (Fisatom, Rio de Janeiro, Brasil). Foram adicionados 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu Sigma–Aldrich (São Paulo, Brasil) e após 3 min de repouso, 200 µL de carbonato de sódio (20%, m/v) foram homogeneizados em vórtex e armazenadas ao abrigo de luz por 60 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis na absorvância de 760 nm (Shimadzu, UV-1800, Tokyo, Japan). A curva de calibração construída com ácido gálico em água na concentração de 50 a 1000 mg de equivalente ácido gálico (EAG)/L, $y = 0,001x + 0,0075$, $R^2 = 0,9979$) e os resultados de fenólicos totais foram expressos em mg EAG por g de casca seca de pinhão.

3.6.2.3 Atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos de casca de pinhão foi avaliado pelos métodos por meio da captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), baseado no sequestro dos radicais livres por 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e baseado na redução do íon ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (FRAP), flavonoides totais e taninos condensados na melhor condição de extração em relação aos fenólicos. As análises foram realizadas por espectrofotometria utilizando Espectrofotômetro Visível Digital modelo 08980DPT (QUIMIS, Diadema, Brasil), em triplicata.

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o 2,4,6-tris(2-piridil)-estriazina (TPTZ), o 6-hidroxi-2,5,7, o ácido 8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) e o sal diamônio de 2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico] (ABTS) foram obtidos da Sigma–Aldrich (São Paulo, Brasil). O persulfato de potássio (Peroxidissulfato Dipotássico) foi obtido pela Êxodo Científica e os demais reagentes foram de qualidade analítica.

3.6.2.3.1 Método do Radical ABTS

Para a determinação da captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), uma solução de ABTS (10%, v/v) foi preparada 16 h antes do experimento pela mistura de 10 mL da solução estoque de ABTS 7 mM com 176 µL de persulfato de potássio 140 mM. A solução foi então diluída em tampão acetato de sódio 48,5 mM pH 4,5, até uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ em 734nm.

Em tubos, 30 µL de extrato (1:40, v/v em água destilada) e 3 mL de solução ABTS previamente preparada foram homogeneizados em vórtex, seguido de repouso no escuro por 2 h. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 734 nm e tampão acetato de sódio foi usado como branco (Re et al., 1999). Os resultados foram calculados usando a curva de calibração Trolox diluído em metanol (0 a 2500 µMTE, $y = -0,0003x + 0,7235$, $R^2 = 0,9976$) e foram expressos em µmol de equivalente Trolox (TE) por g de amostra (casca seca).

3.6.2.3.2 Método do Radical DPPH

O método baseado no sequestro dos radicais livres por 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foi realizado com 50 µL de extrato (1:40 % v/v em água destilada), adicionado de 1,95 mL de solução DPPH, seguidas de homogeneização em vórtex. Logo em seguida, as soluções foram armazenadas por 30 min na ausência de luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. A solução de DPPH (0,0395 mg/mL) foi preparada com etanol 95,5% e tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM, pH 6, proporção 1:1, v/v. O mesmo utilizado para o branco (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), com modificações.

3.6.2.3.3 Método do Radical FRAP

O método baseado na redução do ion ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (FRAP) foi realizado em tubos, com 100 µL de extrato (1:80, v/v em água destilada) ou 100 µL de etanol para o branco e 3,4 mL de reagente FRAP (10 mM TPTZ [2,4,6 tri (2-piridil) -1,3,5 triazina] em HCl 40 mM, FeCl₃ 20 mM e tampão acetato de sódio 300 mM, pH 3,6, na proporção 1:1:10, v/v/v). Os tubos foram homogeneizados em vórtex, incubados em banho-maria a 37 °C, ao abrigo da luz, por

30 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados foram calculados usando a curva de calibração Trolox diluído em metanol (0 a 21 μ M TE, $y = 0,0502x + 0,0045$, $R^2 = 0,9991$) e foram expressos em μ mol de equivalente Trolox (TE) por g de amostra (casca seca).

3.6.2.3.4 Flavonoides totais

Para determinação dos flavonoides totais 500 μ L de extrato (1:25, v/v em água destilada) ou 500 μ L de etanol como branco foram homogeneizados em vórtex com 150 μ L de Nitrito de Sódio (NaNO_2) (5%, m/v, em água destilada). Após repouso de 5 min, foi adicionado 150 μ L de Cloreto de Alumínio (AlCl_3) (10%, m/v em água destilada), seguido de homogeneização em vórtex e repouso de 6 min. Em seguida, a reação foi interrompida com 1 mL de solução de NaOH (1 M, em água destilada). Logo depois, a absorbância foi lida a 425 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram calculados utilizando a curva de calibração de catequina (250 μ g/mL em etanol 80% v/v) (0 a 250 mg CE/L, $y = 0,0049x + 0,0035$, $R^2 = 0,9993$) e expressos em mg de equivalente de catequina (CE) por g de amostra (casca) (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999).

3.6.2.3.5 Taninos condensados

Os taninos condensados foram determinados pelo método de Porter com 0,5 mL de extrato (diluída em etanol 1:60, v/v), 3 mL de solução de butanol e HCl (95:5, v/v) e 0,1 mL de solução de sulfato férrico em HCl (2 N) (2%, m/v). A solução foi aquecida em banho-maria a 95 °C durante 40 min e depois agitada em vórtex. Após o resfriamento, a absorbância foi lida a 550 nm. Um branco foi preparado nas mesmas condições utilizando etanol (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1985). A porcentagem de TC foi calculada conforme a Equação 7. Onde: %Taninos: Porcentagem de taninos condensados; A_{550} : Absorbância da amostra lida a 550 nm; F: fator de diluição na medição espectrofotométrica; %MS: Porcentagem de matéria seca de amostra de casca de pinhão.

$$\text{Taninos (\%)} = (A_{550 \text{ nm}} \times 78.26 \times F) / \% \text{ MS} \quad (7)$$

3.6.2.3.6 Fitosterol total

A análise de fitoesterol total da casca e dos extratos em pó realizou-se com o uso do método baseado em Liebermann–Buchard (LB), conforme Abd-Razak, Chew e Bird (2019). Primeiramente, foram separadas a fase lipofílica (de interesse) da hidrofílica das amostras conforme Lima et al. (2020), com modificações. Foram adicionados 50 mg de amostra (casca ou extrato) e ressuspensos em 1 mL de clorofórmio e 500 µL de água. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex ~1 min e foi centrifugado à 12000 rpm por 7 min. A fração lipofílica (parte de baixo) foi coletada e novamente foi adicionado 1 mL de clorofórmio. Repetiu-se o procedimento de agitação e centrifugação e a segunda fração da parte lipofílica foi coletada e combinada com a primeira. Para melhorar a separação das duas fases, as frações combinadas foram submetidas a uma segunda centrifugação.

Foram dissolvidos 5 mL de ácido sulfúrico em 50 mL de anidrido acético para obtenção do reagente LB. Para quantificação de Fitosterol total, 1,5 mL do extrato lipofílico foi adicionado a tubos de ensaio e misturado com 1,5 mL do reagente LB. Os tubos foram incubados por 15 min no escuro. A absorbância foi medida a 420 nm, utilizando o espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-vis) (Shimadzu, UV-1800, Tokyo, Japan). A formação de cor verde indicou a presença de fitoesterol. Uma curva de calibração foi construída com o padrão β -sitosterol (0,1 a 0,5 mg/mL). Clorofórmio foi utilizado como branco.

3.6.3 Ensaio de toxicidade por *Artemia salina*

A análise com *A. salina* foi realizada nos três extratos obtidos pelos métodos de Infusão, Shaker e Soxhlet, a fim de verificar a concentração máxima para ser adicionada que atinja 50% de letalidade.

A eclosão das larvas de *A. salina* foi realizada com 0,5 g de ovos da larva em 500 mL de água do mar sintética produzida com sal marinho Blue Treasure Reef Sea Salt (Blue Treasure, Hongkong, China) e água ultrapura (30 g/L), pH $8,29 \pm 0,03$, com posterior exposição à luz artificial (lâmpada incandescente de 60 W), 24 h, 26 ± 1 °C. O ensaio foi realizado com 10 exemplares de náuplios, com auxílio de pipeta de Pasteur adicionado em tubos de ensaio com 5 mL de água do mar sintética, e frações de extrato com concentrações finais de 1, 10, 100, 250 e 500 µg/mL (Extrato/ água do

mar sintética). Como controle positivo foi utilizado a água do mar sintética e o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (1 mg/mL) diluído em água do mar sintética, como controle negativo. A morte dos exemplares náuplios foi avaliada em 24 h, em triplicata (FONSECA et al., 2013).

3.6.4 Digestão gastrointestinal *in vitro*

A digestão gastrointestinal *in vitro* das formulações de iogurte, do extrato e da semente foi realizada em 3 fases (oral, gástrica e intestinal), utilizando 3 g de amostra (Figura 8).

As análises foram realizadas segundo Silva et al. (2021), seguindo o protocolo do processo de digestão gastrointestinal (MINEKUS et al., 2014). As três fases digestivas foram incubadas em banho-maria (37 °C), sob agitação em shaker (85 rpm), na fase oral (2 min), gástrica (2 h) e intestinal (2 h). O procedimento ocorreu em dois lotes: i: quatro tubos retirados após a fase oral e gástrica e ii: quatro tubos de cada amostra foram retirados após as três fases. Dos 4 tubos, 2 tubos foram destinados para análise de digestibilidade das proteínas e 2 tubos para fazer os extratos dos compostos bioativos. Água destilada nas mesmas condições das amostras.

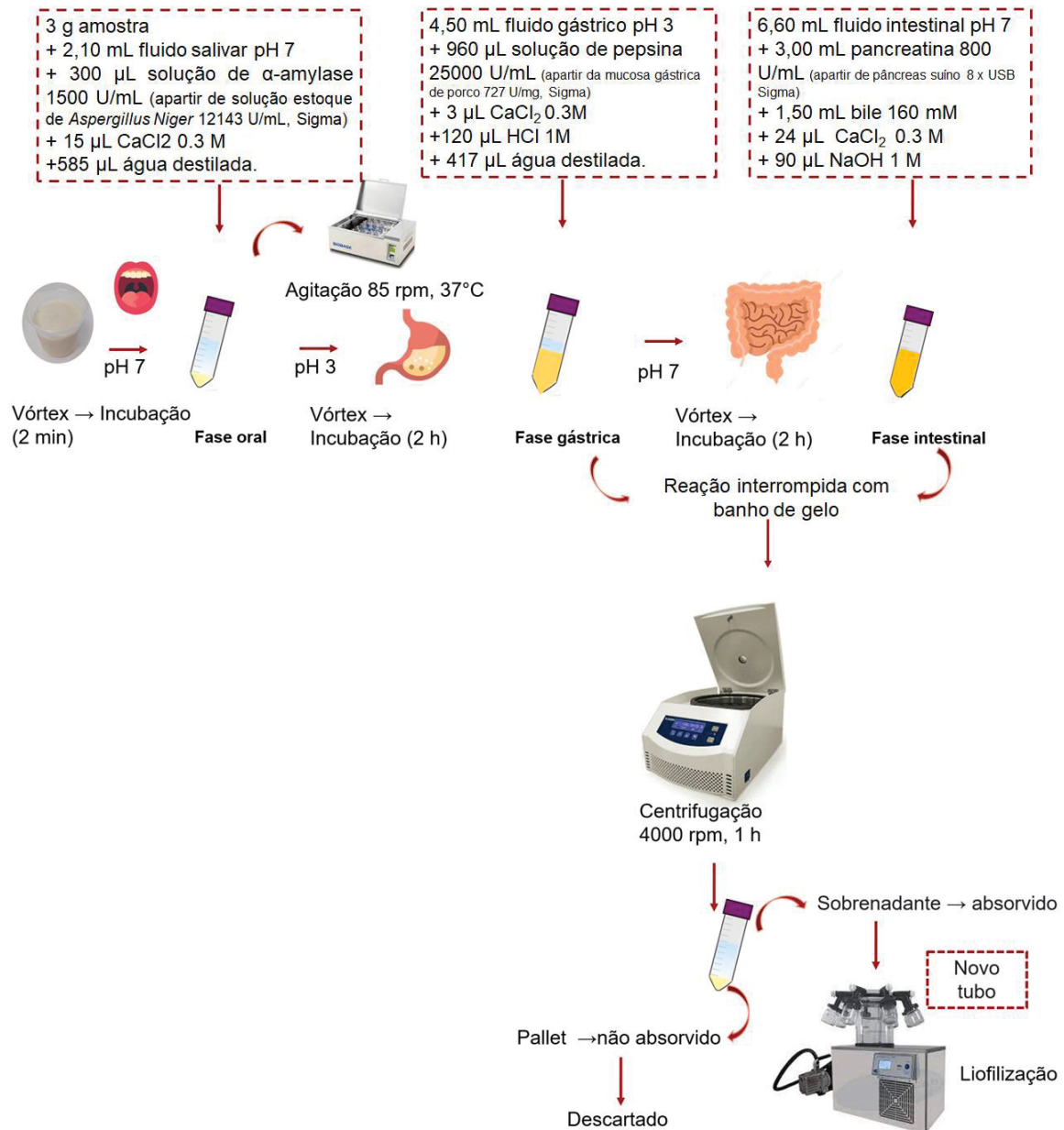
Os fluidos gastrointestinais foram preparados utilizando soluções estoque de KCl, KH_2PO_4 , $NaHCO_3$, NaCl, $MgCl_2 (H_2O)_6$, $(NH_4)_2CO_3$, HCl, H_2O . O NaCl não foi adicionado no fluido salivar, nem o $(NH_4)_2CO_3$ no fluido intestinal. Os fluidos foram preparados e mantidos sob refrigeração até o momento das análises. As enzimas foram preparadas no dia da análise com seus respectivos fluidos, conforme Minekus et al. (2014).

A primeira fase (salivar) ocorreu em pH 7. Em tubo de centrifuga de 50 mL foi adicionado 3 g de amostra, 2,10 mL de fluido salivar pH 7, 300 µL de solução α -amilase 1500 U/mL (a partir de solução estoque de *Aspergillus Niger* 12143 U/mL, Sigma), 15 µL de $CaCl_2$ 0,3 M e 585 µL de água destilada. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex e posteriormente submetido ao banho-maria a 37 °C. Após 2 min os tubos seguiram para a segunda fase.

Na segunda fase (gástrica) foram adicionados 4,50 mL de fluido gástrico pH 3, 960 µL de solução de pepsina 25000 U/mL (provinda da mucosa gástrica de porco 727 U/mg, Sigma), 3 µL de $CaCl_2$ 0,3 M, 120 µL de HCl 1 M e 417 µL de água destilada.

O pH foi ajustado para 3, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C. Após 2 h, metade das amostras foi colocada em banho de gelo e metade seguiu para a terceira fase.

FIGURA 8 - DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*



FONTE: A autora (2022).

Na terceira fase (intestinal), o fluido intestinal foi adicionado (6,60 mL), seguida de pancreatina 800 U/mL (oriundo do pâncreas porcino 8 x USB Sigma) (3,00 mL), bile 160 mM (1,50 mL), CaCl₂ 0,3 M (24 µL), NaOH 1 M (90 µL) e água destilada

(786 µL). O pH foi ajustado para 7 e os tubos foram homogeneizados e incubadas a 37°C. Após 2 h, foram colocados em banho de gelo.

As amostras obtidas após a digestão foram centrifugadas a 4000 rpm por 1 h, o sobrenadante foi recolhido e liofilizado em liofilizador bancada L101 (Liobras, São Carlos, Brasil), a pressão de 88 kPa a vácuo, em - 86 °C.

3.6.4.1 Digestibilidade de proteínas

As proteínas contidas nas amostras liofilizadas digeridas e não digeridas foram determinadas pelo método de *Kjeldahl*, nas amostras antes e após digestão (AOAC, 2016) e a digestibilidade das proteínas foi calculada de acordo com a Equação 8 (SILVA et al., 2021). Onde: A: Nitrogênio total (%) da amostra antes da digestão; B: Nitrogênio (%) do sobrenadante (digerido); 100: Porcentagem.

$$PD (\%) = B / A \times 100 \quad (8)$$

3.6.4.2 Bioacessibilidade dos compostos bioativos

Para preparação de extratos do iogurte digerido e não digerido (3 g) foram adicionados 6 mL de metanol 80%, em duplicata. A extração ocorreu em duas etapas: primeiro foi adicionado aos tubos com as amostras liofilizadas 2/3 de solvente. Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 min, incubados em banho ultrassônico por 30 min, centrifugados a 4 rpm por 10 min e o sobrenadante foi recolhido. A segunda etapa foi repetida com 1/3 do solvente. As análises dos extratos foram realizadas em microplaca, em quadruplicata (SILVA et al., 2021).

Os flavonoides totais foram avaliados conforme Zhishen et al. (1999), com modificações. Resumidamente, 10 µL de amostra/padrão foram misturados com 90 µL de NaNO₂ 5%. Após incubação no escuro por 5 min, 10 µL de AlCl₃ 10% foi adicionado. Por fim, após 5 minutos foi adicionado 90 µL de NaOH 1 M. A mistura foi homogeneizada e deixada por 60 min em repouso no escuro. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de catequina por 100 g de amostra em base seca.

Os fenólicos totais foram avaliados de acordo Singleton e Rossi (1965), modificado por Barbi et al (2019) para microplacas. No procedimento, foi adicionado

240 µL de água destilada, 10 µL de amostra e 15 µL de reagente Folin Cicateau. O conteúdo foi homogeneizado e incubado por 3 min. Após, foi adicionado 15 µL de Na₂CO₃ 20%. Depois de 60 min em repouso no escuro a absorbância foi medida em 690 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico EAG por 100 g de amostra em base seca.

O ensaio de atividade de eliminação do radical ABTS (2, 2'-Azino-bis (3-etilbenztiazolina -6-ácido sulfônico) foi realizado de acordo com o método proposto por Re et al (1999) e adaptado para microplacas (BARBI et al., 2020). O radical catiônico + foi preparado a partir de uma solução estoque (7 mmol/L de ABTS e 140 mmol/L de solução de persulfato de potássio) e permaneceu por 16 h a 25 ° C no escuro. A solução ABTS⁺ foi diluída com metanol, e a absorbância foi ajustada para 0,700 a 734 nm. Foram adicionados 300 µL da solução ABTS em 10 µL de amostra/padrão. Após 30 min de repouso no escuro, a leitura da absorbância foi medida em 690 nm.

A capacidade de redução do radical livre DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil) foi avaliada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), modificado para microplacas (BARBI et al., 2020). Foram adicionados 10 µL dos extratos da amostra a 190 µL da solução do radical DPPH 0,24 mM diluído em metanol. Após 30 min de incubação, a absorbância foi obtida a 515 nm.

O ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) realizado de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996), adaptado (BARBI et al., 2018) para microplacas. A análise ocorreu adicionando em microplaca 10 µL de amostra/ padrão e 300 µL de solução preparada de FRAP (10 mM TPTZ [2,4,6 tri (2-piridil) -1,3,5 triazina]] em HCl 40 mM, FeCl₃ 20 mM e tampão acetato de sódio 300 mM, pH 3,6, na proporção 1:1:10, v/v/v). Após homogeneização e 30 min em repouso no escuro a absorbância foi medida em 570 nm.

Trolox (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi usado como o padrão para os ensaios DPPH, ABTS e FRAP e os resultados foram expressos como µmol equivalente de Trolox (µmol ET) por 100 g de amostras de iogurte, em base seca.

3.6.5 Estabilidade dos iogurtes na sua vida útil

3.6.5.1 Acidez e pH

A acidez e o pH da semente de pinhão e dos iogurtes foram avaliados de acordo com a AOAC (2016).

3.6.5.1 Capacidade de retenção de água

As formulações de iogurte *in natura* foram homogeneizadas e uma alíquota de 10 g foi centrifugada a 3000 rpm, por 10 min (80-2B Centrifuge, Daiki). O sobrenadante foi drenado cuidadosamente e os tubos foram pesados (TRIBST et al., 2018). A capacidade de retenção de água (CRA) foi definida como a proporção da massa restante do pellet após centrifugação até o peso inicial de o iogurte, expresso em porcentagem. O ensaio foi realizado para iogurte após 0 e 30 dias de armazenamento. As análises foram realizadas em triplicata.

3.6.5.2 Sinérese

A sinérese espontânea das formulações de iogurte *in natura* (após 30 dias de armazenamento) foi avaliada de acordo com Oliveira et al. (2014). Uma alíquota de 10 g de cada formulação de iogurte foi inclinada tubo de Falcon em um ângulo de 45, sob refrigeração a 5°C e mantido nesta posição por 1 h. Após, o soro de leite exsudado foi coletado e pesado. A sinérese expressada de acordo com a Equação (9). Onde: MS: massa do soro separado; MT: massa da amostra + embalagem. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\text{Separação do soro (\%)} = \left(\frac{M_S}{M_T - M_F} \right) \times 100 \quad (9)$$

3.6.5.3 Viscosidade

A viscosidade das formulações de iogurte *in natura* após 1 e 30 dias de armazenamento determinou-se com o uso de um viscosímetro Brookfield (DVII + Pro, EUA) (JOUKI et al., 2021), com pequenas modificações. As amostras de iogurte (25 mL) a 20 °C foram despejados no recipiente do viscosímetro encamisado a 20 °C.

Após experimentos preliminares, o spindle com maior torque foi escolhido (LV3) com velocidade do fuso de 20 rpm por 25 s. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.5.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A composição química das formulações de iogurte *in natura* foi avaliada pela Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), nos tempos 0 e 30 dias de armazenamento, em duplicata. Os ensaios por RMN avaliaram principalmente a influência da etapa de adição de semente no iogurte e o seu impacto na vida útil, quanto a formação de ácido láctico e os compostos formados. Os ensaios foram realizados a partir de experimentos preliminares, em busca de melhor visualização das bandas e menor custo. Aproximadamente 2 mL de cada amostra de iogurte, em duplicata, foi centrifugada em centrífuga de bancada Microcentrífuga Capp Rondo 6.000 rpm (Capp, Rio de Janeiro, Brasil), por 10 min. O sobrenadante foi coletado (600 µL) e filtrado com algodão em uma pipeta de *Pasteur* de vidro e adicionado ao tubo de RMN e posteriormente foi adicionado 3 gotas de água deuterada. A análise de RMN ocorreu em temperatura ambiente, com 16 *scans*.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento dos dados relacionados à coletas dos pinhões de diferentes locais (Item 4.1) foi realizado utilizando a Análise de Variância (ANOVA), seguida do método de Tukey, para testar a significância das diferenças das médias de cada variável estudada ($p < 0,05$), utilizando o software STATISTICA versão 13.2 (StatSoft Inc®, Tulsa, OK, EUA).

Para testar possíveis correlações entre as características ambientais gerais das áreas de amostragem e as variáveis nutricionais, foram examinadas variáveis fisiográficas e climáticas baseadas em precipitação, temperatura anual e temperatura do mês de coleta. Devido à falta de dados específicos do local para essas variáveis, bem como a ausência de estações climáticas em alguns municípios, os dados foram modelados para cada local com uso de um aplicativo webline (CLIMATE-DATA.ORG, 2021), que modela parâmetros climatológicos para uma escala de aproximadamente 1 km, usando um conjunto de dados de inteligência artificial que abrange 30 anos. Os valores de precipitação, altitude e temperatura dos dados obtidos foram usados como

variáveis do A.I. dados de software (Tabela S1). Inicialmente foram testadas as variáveis ambientais usando a Análise de Componentes Principais (PCA), a fim de examinar as inter-relações entre as variáveis (HAIR et al., 2013) e fornecer uma estrutura variável simplificada. A análise estatística de PCA e análise de cluster após PCA foram realizadas com o uso do software R Studio (R CORE TEAM, 2020). Análise de PCA e Agrupamento Hierárquico em Componentes Principais foram calculados usando o pacote R “Factominer” (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008). Houve a análise dos dados de acordo com a concentração de compostos de variáveis nutricionais e ambientais dependendo dos locais de coleta.

A maximização dos extratos (Item 4.2) se realizou por meio de planejamentos fatoriais dos extratos, gerados e avaliados pelo software Statistica 7® (StatSoft Incorporation, Tulsa, OK, USA). A significância dos coeficientes do modelo experimental foi avaliada por ANOVA (95%) a fim de ajustar os modelos experimentais quanto à resposta de fenólicos totais (mg EAG/g amostra). Posteriormente, o ajuste geral do modelo contendo os coeficientes significativos foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e ANOVA (95%, erro puro e falta de ajuste).

Os gráficos de contorno foram obtidos para os modelos validados, para as respostas com a terceira variável independente fixada no ponto central. Os dados foram submetidos à ANOVA e os tratamentos analisados pelos testes de comparações múltiplas de Tukey, também utilizado o mesmo software. Além disso, usou-se a análise de PCA e de Cluster para avaliar os dados obtidos dos dois métodos de extração maximizados (Infusão e o Shaker) e o Soxhlet, e quanto ao rendimento dos extratos, capacidade redutora do reagente Folin Cicateau e potencial antioxidante.

Em relação as análises do iogurte adicionado de semente e extrato (Item 4.3), os tratamentos dos dados foram realizados com o software Jamovi, versão gratuita 2.2.5. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e posteriormente submetidos à ANOVA e os tratamentos analisados pelo teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$), para grupos > 3 ; e comparação entre 2 grupos, o teste T ($p < 0,05$) realizado na análise das formulações de iogurte; e teste T pareado para análise de vida útil. A correlação de Spearman ($p < 0,05$) foi usada para distribuição não normal. A PCA foi realizada com dados previamente avaliados pelo teste de Bartlett e teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO). O pacote snowCluster foi utilizado para plotar gráficos de PCA e análise de cluster, com dados padronizados pelo programa.

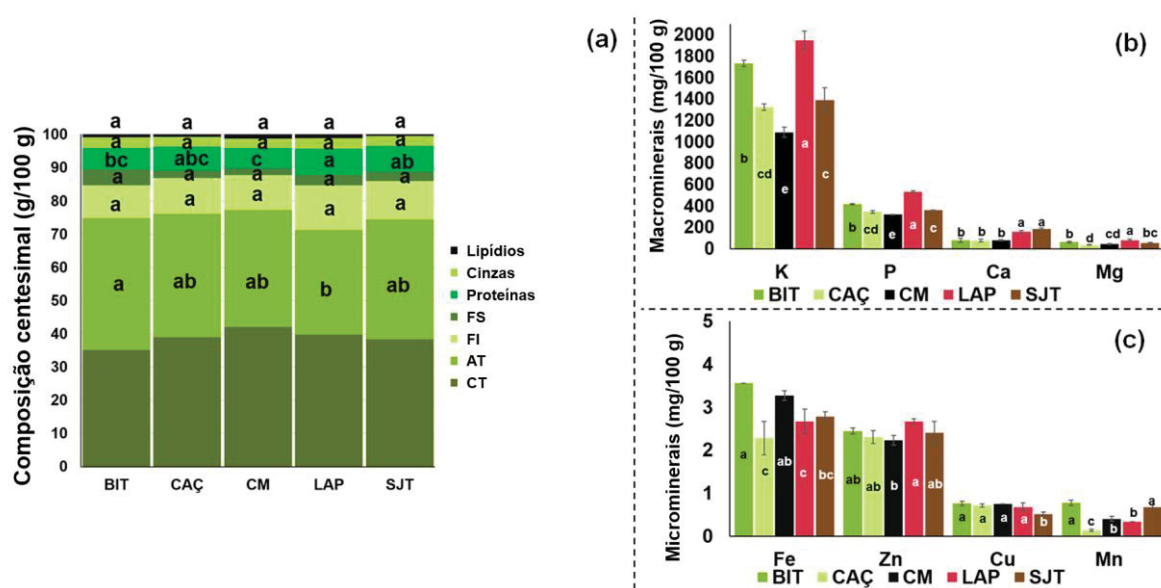
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Relacionando a origem geográfica com as propriedades nutricionais, minerais e visuais do pinhão (semente de *Araucaria angustifolia*) do sul do Brasil.

4.1.1 Efeitos da origem do pinhão na composição nutricional da semente de pinhão cozida

A umidade das amostras de pinhão cozido expressos em base seca, variou de $45,94 \pm 0,37\%$ para Caçador a $49,38 \pm 0,14\%$ para Bituruna. São João do Triunfo, Lapa e Cruz Machado apresentaram valores intermediários, com diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 9 e Tabela S1).

FIGURA 9 – CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE PINHÃO DE CINCO LOCALIDADES DA REGIÃO SUL DO BRASIL



FONTE: A autora (2021)

Composição centesimal (a); macrominerais (b), microminerais (c) de sementes, em base seca*. As letras sobrescritas são os dados estatísticos de Tukey, em que as mesmas letras não diferem estatisticamente do mesmo atributo de medida ($p < 0,05$). BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo. FS: Fibra alimentares solúveis; FI: Fibras alimentares insolúveis; AT: Amido total; CT: Carboidratos totais.

O conteúdo de carboidratos totais apresentou variação de $35,09 \pm 0,01$ g/100 g para Bituruna a $42,09 \pm 0,12$ g/100 g para Cruz Machado (Figura 9, A). O amido total

(Figura 9, A) das amostras apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes localidades. Bituruna ($39,72 \pm 2,88$ g/100 g) apresentou o maior valor de amido total e Lapa o menor ($31,43 \pm 0,26$ g/100 g). Os demais municípios situados entre essas duas localidades não foram significativamente diferentes. Por outro lado, o amido resistente, contido no amido total, não variou estatisticamente ($p < 0,05$), e os valores obtidos tiveram em média $4,30 \pm 0,50$ g/100 g. As diferenças nos valores de amido total podem ser atribuídas ao maior conteúdo de proteína presente na amostra Lapa ($8,00 \pm 0,33$ g) corroborando com as sementes de pinhão analisadas por Silva et al. (2022). Os alimentos que contêm amido resistente são importantes para a alimentação humana, pois esse nutriente é um tipo de fibra alimentar solúvel e resistente às enzimas digestivas do trato digestivo superior. Dessa forma, podem trazer benefícios à saúde como a prevenção de processos patológicos, incluindo câncer de cólon, diabetes e obesidade (BAI et al., 2021).

Em relação as fibras alimentares, não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes fontes ($p < 0,05$) (Figura 9, A). A quantidade de fibras totais ficou em torno de $14,18 \pm 1,56$ g/100 g, o que corresponde $11,22 \pm 1,37$ g/100 g de fibras insolúveis e $2,95 \pm 1,01$ g/100 g de fibras solúveis. Não houve diferenças ($p > 0,05$) entre o conteúdo de cinzas ($2,9 \pm 0,2$ g/100 g) e lipídios ($0,9 \pm 0,3$ g/100 g) das amostras de pinhão cozido de diferentes regiões (Figura 9, A). Por outro lado, as quantidades de proteínas foi significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre as amostras de pinhão de diferentes localidades (Figura 9, A), com maiores valores para Lapa ($8,00 \pm 0,33$ g/100 g) e menores valores para Cruz Machado ($6,17 \pm 0,23$ g/100 g), representando uma variação de 29% em seu conteúdo. Isso pode ser atribuído a diferentes metabolismos de plantas, variação de nutrientes do solo, como nitrogênio, ou a uma combinação desses fatores. Um estudo anterior (BARBOSA et al., 2017) indicou que a disponibilidade de P e K no solo afetou o acúmulo desses elementos na epiderme, enquanto o tipo de tecido e a formação de cristais foram características chave para a dinâmica dos nutrientes na semente de *A. angustifolia*.

Algumas das variações no conteúdo nitrogênio também foram atribuídas anteriormente ao clima e à genética, sendo que temperaturas médias acima de 22°C levam ao aumento de matéria orgânica (ALVARES et al., 2013), resultando na formação de pinhões com crescimento mais intenso e enchimento de sementes (BARBOSA et al., 2019).

A desidratação das sementes nos estádios finais de maturação durante os meses de abril a maio também aumenta a quantidade de proteínas (PERALTA et al., 2016). No entanto, é possível que a influência do estágio de maturação não tenha contribuído para essas variações, uma vez que os pinhões foram colhidos quando já estavam maduros, no chão das árvores.

O valor calórico total (VCT) das amostras apresentou variação ($p < 0,05$) de $1392,4 \pm 0,14$ kJ/100 g para Lapa e $1440,93 \pm 1,98$ kJ/100 g para Cruz Machado. Os altos VCT mostraram que o pinhão pode ser uma fonte de energia, atribuída principalmente ao alto conteúdo de carboidratos e amido total. Corroborando com estudos anteriores, mostrando que o pinhão é uma fonte essencialmente de amido, além de não conter glúten (CORDENUNSI et al., 2004). O pinhão também é uma fonte significativa de fibra alimentar total, predominantemente do tipo insolúvel (entre 2,15 e 5,10 vezes maior que a da fibra solúvel). Os valores da composição nutricional da semente de pinhão cozida foram próximos aos relatados na literatura (GIL et al., 2021; SCHVEITZER et al., 2014; SILVA et al., 2022). Apenas um estudo avaliou o conteúdo de amido total e resistente de sementes cozidas e os valores encontrados são duas vezes maiores do presente estudo (CORDENUNSI et al., 2004).

Ao comparar o pinhão cozido e o arroz branco cozido, cereal consumido mundialmente, as sementes contêm 80% de proteína total e apresentam maiores em lipídios (2,4 vezes) e cinzas (9,7 vezes). Além de ter uma característica importante, que é um alto conteúdo de fibras totais (4,9 vezes) superior, 13,3 e 1,6 vezes para insolúveis e solúveis (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008) o que leva a um impacto significativo no funcionamento do organismo humano. Alguns tipos de fibras podem melhorar os níveis de colesterol no sangue, perfis lipídicos e sensibilidade à insulina. Além de poder prevenir diversas doenças crônicas, como diabetes, obesidade e câncer de cólon (LI; KOMAREK, 2017). Também fornece a mesma relação de minerais que é apresentada no arroz (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). Desse modo, o consumo do pinhão cozido pode fornecer nutrientes benéficos a saúde humana, com baixo perfil glicêmico (CORDENUNSI et al., 2004); portanto, torna-se um excelente alimento.

O conteúdo mineral das sementes foi significativamente diferente ($p < 0,05$) para as localidades avaliadas (Figura 9, B e C). As quantidades dos minerais de K variaram de $1.088,87 \pm 47,52$ e $1.950,55 \pm 84,03$ mg/100 g, e P de $320,37 \pm 1,97$ e $534,23 \pm 11,80$ mg/100 g, mas esses minerais apresentaram comportamento

semelhante entre localidades com correlação de Pearson de 0,86, ou seja, quando um aumenta, o outro também segue a mesma tendência. A maior diferença ocorreu entre Lapa e Cruz Machado que foram 79% e 67% para K e P. Esses contrastes podem ser atribuídos a diferenças na disponibilidade desses elementos no solo, de forma semelhante ao efeito na composição da semente da *A. angustifolia* (BARBOSA et al., 2017).

Os valores de Ca ficaram entre $77,07 \pm 14,13$ e $186,80 \pm 10,97$ mg/100 g e Mg $36,16 - 80,79$ mg/100 g, sendo que os menores valores minerais de ambos foram de Caçador, e os maiores foram de São João do Triunfo para Ca e Lapa para Mg. Variações de Ca (142%) e Mg (123%) na semente têm sido atribuídas a uma redução no transporte floema de Ca devido à redução da transpiração das sementes, em comparação com a das folhas, bem como a redução do movimento, uma vez que está principalmente associado às paredes celulares (WHITE, 2012) e aos cristais de oxalato (BARBOSA et al., 2017).

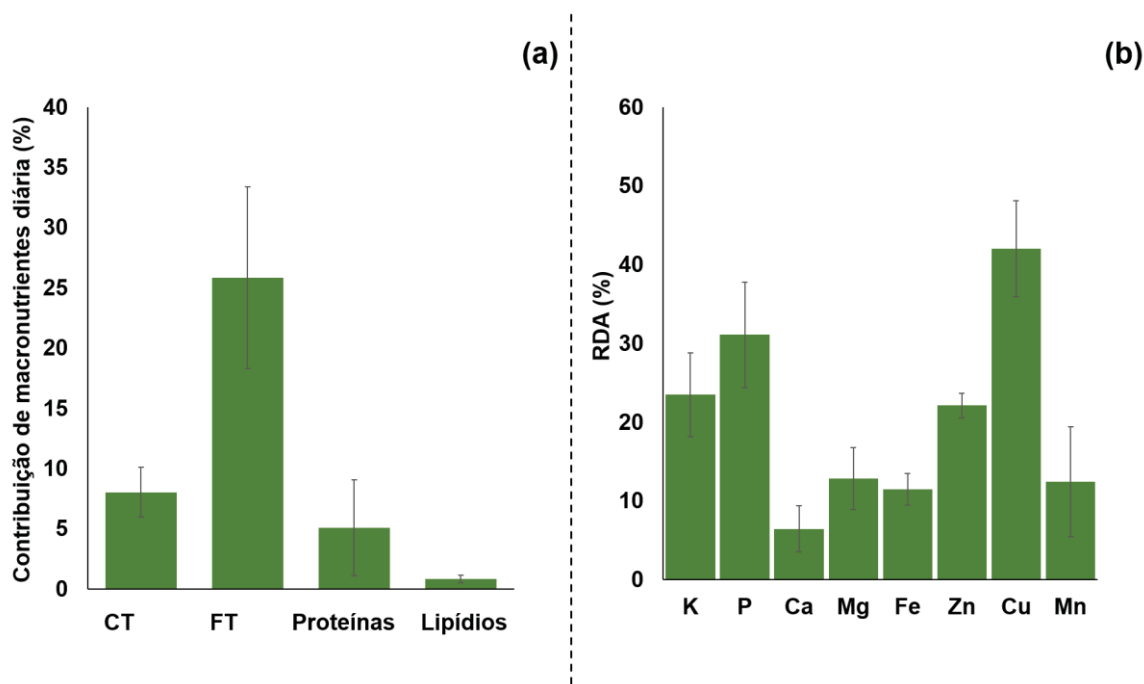
Os micro minerais (Figura 9, C) (Fe ($2,28 \pm 0,39$ e $3,56 < 0,01$ mg/100 g), Zn ($2,23 \pm 0,11$ e $2,67 \pm 0,06$ mg/100 g), Cu ($0,52 \pm 0,04$ e $0,76 \pm 0,05$ mg/100 g) e Mn ($0,14 \pm 0,02 - 0,78 \pm 0,06$ mg/100 g)) também mostraram diferenças para todas as amostras dependendo da origem, com variação entre as amostras de 19 e 472% dependendo do mineral. Ainda, em 75% dos casos, a amostra Bituruna apresentou valores superiores dos minerais. As variações dos valores obtidos para cada mineral foram menores do que estudo anterior (BARBOSA et al., 2019), possivelmente devido ao estudo contemplar mais localidades do que o presente estudo.

4.1.2 Contribuição nutricional da semente de pinhão na dieta

A contribuição de macro e micronutrientes para o consumo de 100 g de pinhão (~45% de umidade) ao dia, com base em valores médios máximos e mínimos pré-estabelecidos para homens e mulheres adultos (IOM, 2005) estão apresentados na Figura 10 e Tabela S2. Nesse sentido, a semente do pinhão fornece em média 8,04% de carboidratos, 25,85% de fibras, 5,07% de proteínas e 0,84% de lipídios dos nutrientes diários de uma alimentação saudável (IOM, 2005). O *Institute of Medicine* IOM (2005) apresenta uma faixa aceitável de distribuição de macronutrientes para carboidratos (45%-65% de energia), proteína (10%-35% de energia) e lipídio (20%-

35% de energia). Essas proporções fornecem limites aceitáveis para atender a maioria das necessidades de macronutrientes para indivíduos ativos.

FIGURA 10 - CONTRIBUIÇÃO DOS MACROELEMENTOS DIÁRIA (A), INGESTÃO DIETÉTICA RECOMENDADA (RDA) (B)



FONTE: A autora (2021).

Distribuição de macronutrientes por dia, considerando dieta com 2000 kcal/dia. CT: Carboidratos totais (45%–65% de energia); FT: Fibras alimentares totais: ingestão adequada (IA) de fibras, 25–38 g de fibras por dia para mulheres e homens, respectivamente; Proteínas (10%–35% de energia) e Lipídios (20%–35% de energia). RDA, valor médio: P (700 mg), K (3510 mg), Ca (1000 mg), Mg (240 mg), Cu (0,9 mg), Fe (14 mg), Mn (2,1 mg), Zn (6 mg) (WHO, 2012; WHO/FAO, 2004).

O pinhão é considerado uma “fonte de alto conteúdo de fibras alimentares”, pois seu valor de fibras alimentares por 100 g de sólidos de 7,48 g é maior que os 6 g exigidos, de acordo com as regulamentações do país (BRASIL, 1998). Deve-se notar que uma ingestão adequada (IA) de fibras alimentares para adultos (19 a 50 anos) é de 38 g de fibras por dia para homens e 25 g de fibras por dia para mulheres (WHO, 2012; WHO/FAO, 2004). Portanto, o consumo do pinhão sozinho não é suficiente para a demanda diária de homens e mulheres.

Os valores minerais para a RDA são continuamente atualizados para refletir as necessidades do corpo humano, considerando as interações entre os elementos, faixas etárias e sexo. De acordo com a Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998), um alimento cujos valores sejam superiores a 15% da demanda

mineral diária, segundo a RDA, é considerado alimento fonte nesse componente. Desta forma, o pinhão é fonte de Cu (42,2%), P (31,1%), K (23,5%) e Zn (22,1%). Os resultados de Barbosa et al. (2019) indicam que o pinhão *in natura* é fonte de Cu (43,6%), P (32,8%), Mn (25,0%) e K (18,5%), enquanto os resultados de Schweitzer et al. (2014) indicam que o pinhão é fonte de Fe (81,4%), Mn (52,4%), P (29,4%) e Cu (22,2%). Isso revela várias diferenças, que podem ser atribuídas à origem e variações ambientais.

Ressalta-se que algumas das amostras puderam ser classificadas como fonte de Mg, e que depende do local de origem (Tabela S2), revelou a importância do estudo da composição e origem da matéria-prima. Em relação ao Ca, todas as amostras apresentaram baixa disponibilidade desse nutriente, característica do pinhão. No entanto, os pinhões avaliados neste estudo, foram 4 vezes maiores em Ca do que as relatadas em estudos anteriores (BARBOSA et al., 2019; CORDENUNSI et al., 2004). A disponibilidade relativamente baixa de Ca pode não ser crítica, uma vez que o pinhão pode ser combinado com outras fontes alimentares ricas nesse componente (IKEDA et al., 2018).

Assim, o consumo do pinhão pode contribuir para um aumento significativo na ingestão dos nutrientes Cu, P e Zn, pois, em média, a população do Brasil (tanto homens quanto mulheres) ingere apenas 21,2% do seu conteúdo de Cu necessário, 12,0 % de P e 22,5% de Zn (ARAUJO et al., 2013). Ademais, a semente contém pequenas quantidades de Ca e Mg, que podem complementar os 88,6% de Ca e 72,6% de Mg dos níveis adequados de ingestão diária recomendados que são, em média, consumidos pela população brasileira (ARAUJO et al., 2013).

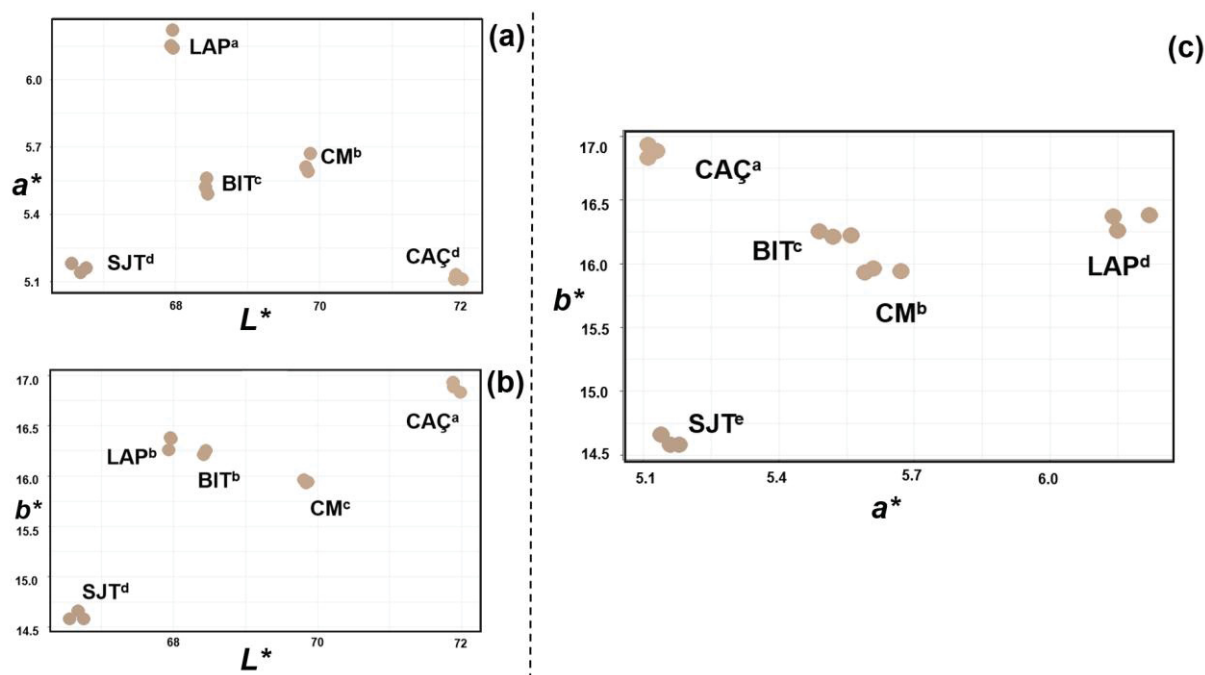
Portanto, o consumo do pinhão cozido, bem como sua utilização no preparo de alimentos, pode produzir um alimento suplementar rico em carboidratos e fibras alimentares, além de fonte dos minerais Cu, P, K e Zn. Além disso, a origem geográfica é um fator diferencial que potencialmente estimula sua comercialização.

4.1.3 Avaliação colorimétrica

Os valores para os componentes dos testes colorimétricos foram obtidos após a moagem dos pinhões cozidos, tons amarelo-acastanhados podem ser vistos em todos os gráficos (Figura 11). As localidades Cruz Machado e Bituruna apresentaram os parâmetros L^* , a^* e b^* mais próximos, embora estatisticamente diferentes ($p <$

0,05). Ao calcular a variação de cor (ΔE), a maioria das amostras não apresentaram diferença perceptível ao olho humano, por estarem com o $\Delta E < 2$ (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975; MALTA et al., 2021), as que mais apresentaram diferença foram entre Caçador $\Delta E > 2$ e Lapa (Tabela 5).

FIGURA 11 - ESPAÇOS DE CORES CIELAB DAS SEMENTES DE PINHÃO COZIDAS DE DIFERENTES ORIGENS



FONTE: A autora (2021).

Gráficos de a^* versus L^* (a), b^* versus L^* (b), b^* versus a^* (c). Em que: L^* (grau de brilho: 0: preto; 100: branco); a^* ($+a^*$: grau de cor vermelha; $-a^*$: grau de cor verde); b^* ($+b^*$: grau de cor amarelo; $-b^*$: grau de cor azul). As letras sobrescritas são os dados estatísticos de Tukey, onde as mesmas letras não diferem no mesmo gráfico ($p < 0,05$). BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo.

TABELA 5 – PARÂMETROS DE COR DA SEMENTE DE PINHÃO COZIDA

Parâmetros	BIT	CAÇ	CM	LAP	SJT
ΔE_{BIT}	-	$1,56 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,03$	$1,74 \pm 0,03$
$\Delta E_{CAÇ}$	$1,56 \pm 0,12$	-	$1,41 \pm 0,06$	$4,21 \pm 0,17$	$2,29 \pm 0,06$
ΔE_{CM}	$0,32 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,03$	-	$1,10 \pm 0,09$	$1,99 \pm 0,01$
ΔE_{LAP}	$0,33 \pm 0,02$	$4,21 \pm 0,08$	$1,10 \pm 0,06$	-	$2,17 \pm 0,06$
ΔE_{SJT}	$1,74 \pm 0,02$	$2,29 \pm 0,05$	$1,99 \pm 0,11$	$2,17 \pm 0,08$	-

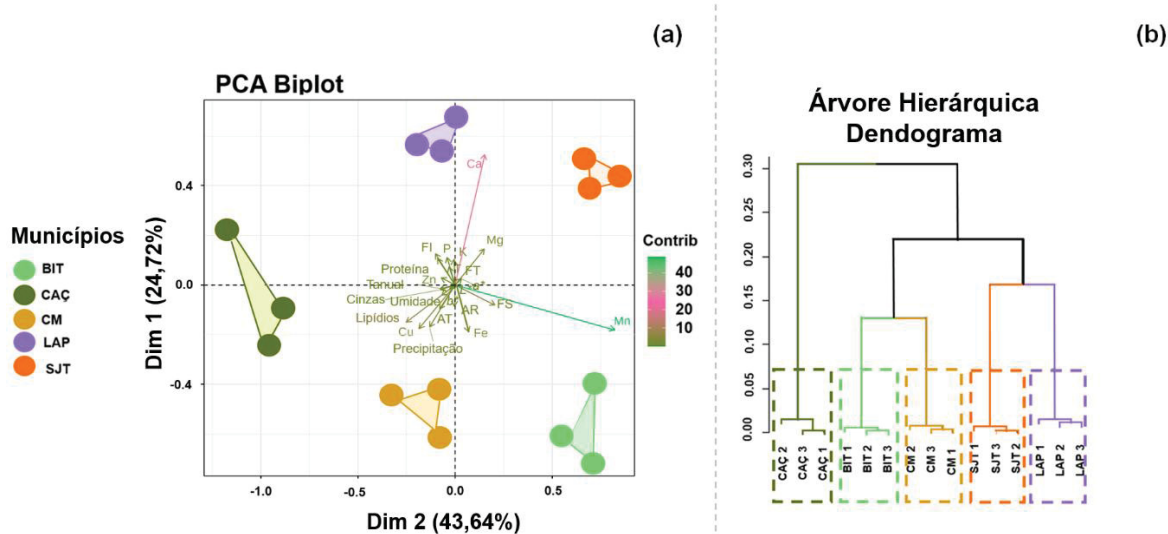
FONTE: A autora (2021).

Médias $\pm$ desvio padrão. ΔE : Variação de cor; BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo.

4.1.4 Análise de componentes principais e agrupamento hierárquico por princípio componentes

Na Figura 12 A, mostrou a análise de componentes principais (PCA) para apresentar o comportamento da cor nutricional e das variáveis ambientais, considerando ainda os diferentes locais de coleta de pinhão. Os resultados mostram que a PCA é capaz de explicar 68,36% da variação entre as amostras, considerando a composição nutricional, minerais, cor e variáveis ambientais como temperatura média anual e precipitação anual. Os municípios relatados apresentaram características distintas que levaram, em sua maioria, a estar em cada quadrante específico, um caso único é o Caçador em que algumas das amostras estavam no quadrante inferior esquerdo, juntamente com Cruz Machado.

FIGURA 12 – ANÁLISE MULTIVARIADA DAS VARIÁVEIS NUTRICIONAIS E AMBIENTAIS DE SEMENTES DE PINHÃO DE DIFERENTES ORIGENS



FONTE: A autora (2021).

Análise de componentes principais (a), árvore hierárquica: dendrograma de cluster (b). BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo. AT: Amido total; AR: Amido resistente; FT: Fibra alimentar total; FI: Fibra alimentar insolúvel; FS: Fibra alimentar solúvel; L^* , a^* e b^* : parâmetros de cor. Precipitação: Precipitação anual, T anual: Temperatura anual são variáveis ambientais por Climate-data.org.

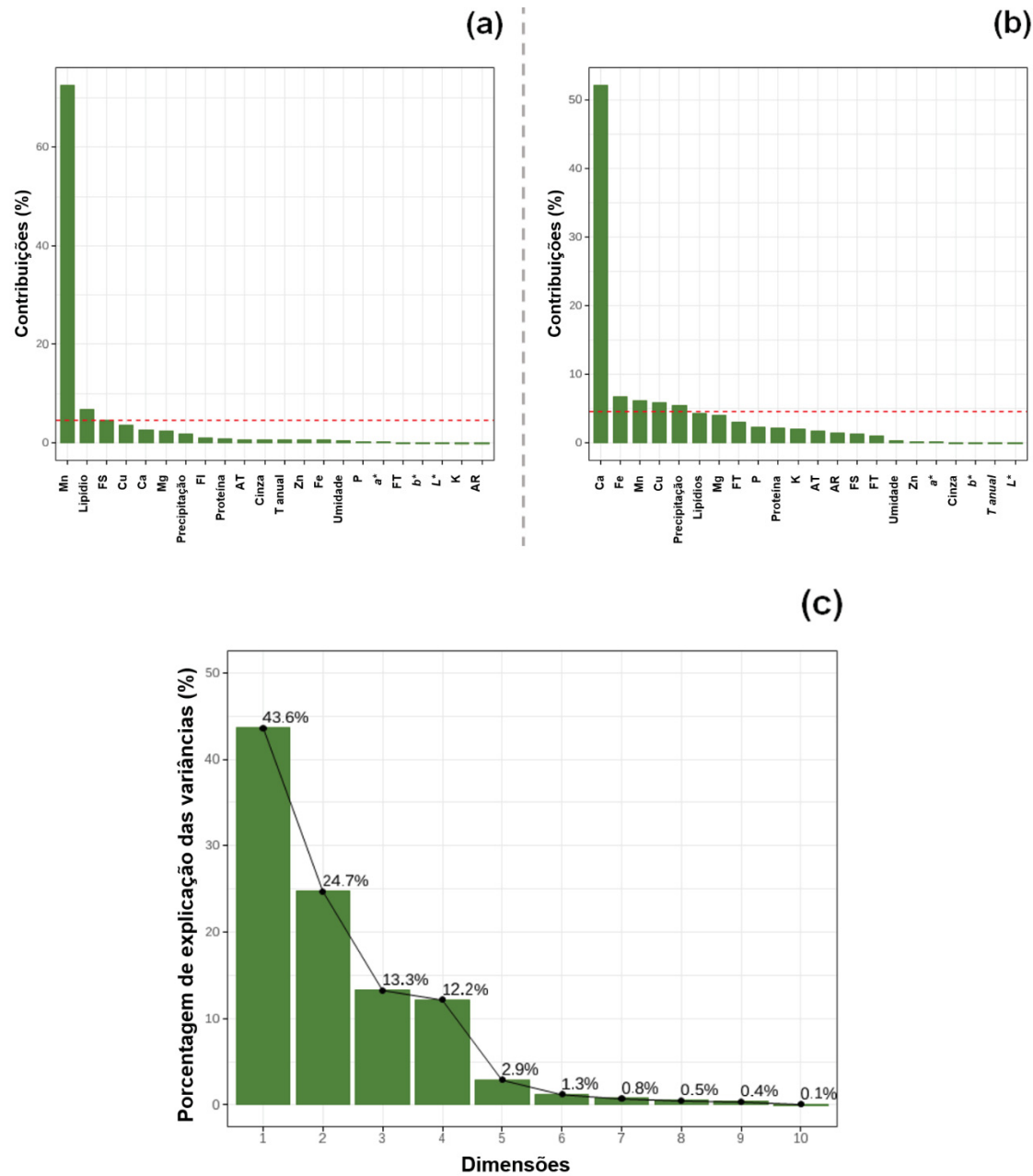
A Figura 12 B mostra a análise de agrupamento realizada após o PCA (agrupamento hierárquico em componentes principais). Como esperado, o agrupamento seguiu as características do PCA com informações mais detalhadas

enquanto o Caçador foi o mais distinto, enquanto Bituruna e Cruz Machado, bem como São João do Triunfo e Lapa foram agrupados individualmente se apenas três divisões em barras forem consideradas (linhas pretas na Figura 12 B). Na Figura 13 A-C mostra a contribuição de cada variável nas dimensões 1 e 2. As características de Caçador, distintas das demais localidades, podem estar relacionadas à sua posição geográfica, por ser a mais distante, pois as demais são vizinhas aos pares (Figura 4). Além disso, Caçador apresentou temperaturas anuais e mensais de coleta mais baixas que os demais, sendo uma das localidades mais altas e chuvosas estudadas (Tabela S1).

Após ser dividido em 5 clusters, notou-se que o cluster 1, composto por Caçador (Tabela S3) é caracterizado por valores elevados nos componentes colorimétricos (b^* e L^*), composição química (cinzas, umidade, amido total e proteína), variáveis ambientais (precipitação e temperatura anual) e Zn. Por outro lado, apresentou baixos valores de Mg e Mn. O cluster 2, composto por Cruz Machado, é caracterizado por valores de lipídios mais altos, Fe e baixos valores de P e K. Já o cluster 3, composto por Lapa, é caracterizado por altos valores dos minerais P, Mg e K, além de apresentar parâmetro de cor característica a^* . Porém com baixos valores de Fe, parâmetro de cor L^* , umidade, amido total e resistente, temperatura anual e precipitação.

O cluster 4, composto por Bituruna, é caracterizado por valores mais altos de fibra alimentar solúvel, por apresentar valores mais baixos de Ca, proteína, fibra alimentar insolúvel, temperaturas anuais e de julho. Por fim, o cluster 5, composto por São João do Triunfo, é caracterizado por altos valores de Ca, e baixos valores de lipídios e Cu. Essas interações encontradas na PCA podem estar relacionadas a um estudo anterior de Yu et al. (2021), que avaliaram a composição química de diferentes genótipos de edamame [*Glycine max*(L.) Merr.] produzidos em diferentes localidades. O estudo mostrou que as localidades tiveram um efeito no conteúdo de proteína, umidade, lipídios, amido, fibras. O genótipo não apresentou variação significativa no valor de fibras, possivelmente devido à proximidade genética (YU et al., 2021), mas comparando as localidades, a interação foi significativa apenas em proteína e amido.

FIGURA 13 – CONTRIBUIÇÃO DA PCA POR VARIÁVEIS DAS DIM 1 (A), DIM 2 (B) E PERCENTAGEM DE EXPLICAÇÃO DAS VARIÂNCIAS (C)



FONTE: A autora (2021).

CT: Carboidratos totais; AT: Amido total; AR: Amido resistente; FT: Fibras alimentares totais; FI: Fibras alimentares insolúveis; FS: Fibras alimentares solúveis; L^* , a^* e b^* : parâmetros de cor. Precipitação: Precipitação anual, T anual: Temperatura anual são variáveis ambientais.

As variações nos valores de proteínas foram justificadas pelos autores devido as mudanças de temperatura, como em estudos anteriores, enquanto que o maior em de proteínas foi encontrado em temperaturas diurnas superiores à 30 °C (WOLF et al., 1982). As variações na umidade foram relacionadas à maturação das amostras, pois a umidade diminui gradativamente ao longo do desenvolvimento das sementes (XU et al., 2016). No entanto, o amido, nos locais onde as sementes apresentavam maior sacarose, glicose e frutose tiveram valores maiores do que aqueles com menores conteúdos desses açúcares.

Esses resultados reforçam a hipótese, que tem sido já proposto por outros pesquisadores, que as variações na composição nutricional do pinhão são dependentes sobre a expressão genética da variedade vegetal, estágio de maturação, características do solo e do clima, irrigação técnicas e desidratação no final da maturação (ASTARITA; FLOH; HANDRO, 2003), mas não representam um fator crítico pela sua ampla utilização como matéria-prima agroindustrial.

No entanto, essa diversidade pode representar em breve uma oportunidade para classificar a origem do pinhão segundo o seu relevo; um conceito que já foi aplicado ao vinho, café, chocolate, chá, carne, queijo e outros produtos que são influenciados por sua localização de origem.

4.1.5 Relação do solo, geografia e características ambientais com a composição do pinhão

Os parâmetros geográficos dos locais de coleta (Tabela 6) apresentam uma variação de 300 mm na precipitação anual, com uma variação de 131 m de altitude. No geral, esses municípios podem ser considerados como continentais, com pouco efeito do clima marítimo. Os valores Continentalidade de Johansson são normalmente considerados no hemisfério norte, então os aqui encontrados designados como marítimos precisam ser avaliados com alguma reserva, devido estarmos no hemisfério sul. Entretanto, as medições de oceanidade mostraram que esses locais de coleta foram considerados continentais. Especificamente, o Índice de Oceanidade de Marsz foi ajustado para a Ilha King George, hemisfério sul, e pode se adaptar melhor aos dados climáticos aqui atribuídos. Desse modo, as medições de aridez classificaram esses locais como extremamente úmido, devido as especificidades do ecossistema da Floresta Ombrófila Mista. No entanto, o *Pina Combinate Index* de Zambakas que

compensa a precipitação anual com mensal apresentam que o município Lapa foi o mais singular que apresentou um ambiente semi-úmido.

Os dados de solos coletados em cada município, em diferentes profundidades, são fornecidos na Tabela S4, através do banco de dados da Embrapa Solos. No geral, há maior quantidade de carbono e nitrogênio e os nutrientes dentro do solo no nível do solo. Os óxidos variaram dependendo da profundidade do solo. Segundo Silva et al. (2001), as Araucárias extraem nutrientes da camada mais profunda do solo do que dos solos rasos, sendo a profundidade do solo mais importante do que sua composição química. Pois foi observado maior crescimento em volume, associado a maior sobrevida, quando a araucária foi presente em solos mais profundos (média de 20 m³/ha), em comparação com um crescimento em solos pedregosos (16,6 m³/ha) e solos rasos (média idade de 12,2 m³/ha).

Portanto, é possível observar que Bituruna apresentou os maiores valores de nutrientes para solos mais profundos e poderia ter ajudado na absorção pelas sementes seguidas por Lapa e Caçador. Além disso, o pH do solo permaneceu globalmente constante na profundidade de medição e foi exclusivo para cada terreno. No entanto, o município que apresentou constituintes com maior quantidade de óxido foi em Cruz Machado, que pode ser devido a ele apresentar maior conteúdo de cinzas.

TABELA 6 - VARIÁVEIS AMBIENTAIS DOS MUNICÍPIOS ENVOLVIDOS NO ESTUDO

Parâmetros	BIT	CAÇ	CM	LAP	SJT
Precipitação anual (mm)	1751	1707	1451	1320	1451
Altitude (m)	881	914	786	917	786
Geologia	Basalto (Ígnea)	Basalto (Ígnea)	Basalto (Ígnea)	Sedimentar	Sedimentar
Continentalidade por JCI	Maritimo 20,95	Maritimo 16,08	Maritimo 24,64	Continental 39,94	Continental 47,16
Oceanidade ¹ por KOI	Continental 0,96	Continental 0,47	Continental 1,95	Continental 1,49	Continental 0,48
Oceanidade ² por MOI	Continental 1,26	Continental 1,31	Continental 1,22	Continental 1,24	Continental 1,18
Aridez (IDm)	Extremamente úmido 65,83	Extremamente úmido 64,9	Extremamente úmido 62,74	Muito úmido 49,62	Muito úmido 52,96
PCI (Ip)	Muito úmido 35,26	Muito úmido 35,17	Úmido 33,6	Semi-úmido 26,38	Úmido 28,06

FONTE: A autora (2021).

BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo. A precipitação anual e a altitude foram obtidas pelo site Climate.org; A Geologia foi classificada de acordo com a classificação climática de Köppen; Continentalidade por Continentalidade de Johansson (JCI); Oceanidade¹: Índice de Oceanidade de Kerner; Oceanidade²: Índice de Oceanidade de Marsz (MOI); Aridez por De Martonne; PCI: *Pina Combine Index* de Zambakas (1992).

A análise de PCA dos dados geográficos e de solo foi realizada (Figura S1), e os dados de profundidade foram usados no PCA como intensidade de indivíduos e variáveis. No geral, o agrupamento hierárquico no componente principal não foi capaz de agrupar os indivíduos corretamente. Como algumas únicas características são vistas apenas para Caçador1, Bituruna1, Cruz Machado1 e Lapa, isso pode ser atribuído ao alto conteúdo de nutrientes na baixa profundidade dos solos dos municípios, que não foram vistos nas mais profundas. Portanto, os dados do solo foram usados apenas como correlação com micro e macronutrientes das sementes de pinhão.

A correlação de Pearson dos nutrientes da semente (.P) (Figura S2) com solo (.S) e geografia (.G) apresentam poucas semelhanças. Por exemplo, os padrões não relacionados a planta, como a oceânica e a altitude são percebidas. Porém, mais importante, para os nutrientes das sementes (denominados como .P), como Cu e proteína, parece haver uma correlação negativa com óxidos metálicos do solo (como SiO_2 e Al_2O_3), que por sua vez estão negativamente correlacionados com o índice de oceanidade, que pode ter sido devido ao clima e ao solo mais pedregoso. Contudo, Fe foi positivamente correlacionado com Al_2O_3 e relação C/N. O Mn da semente foi positivamente correlacionado com o K do solo, também é um fenômeno comum, pois um índice muito alto pode bloquear a absorção de Mn. Adicionalmente, alguns minerais da semente, como o Ca, parecem sugerir alguma correlação negativa com o índice de aridez, como esperado porque a Floresta Ombrófila Mista consiste em uma ambiente úmido.

4.1.6 Considerações finais

Esse trabalho investigou as variações na composição nutricional entre os diferentes locais de coleta de semente de pinhão. Houve variações significativas nas quantidades de minerais, proteínas, umidade e amido total. Enquanto para o amido resistente, as fibras alimentares, os lipídios, e as cinzas foram iguais. Os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* foram estatisticamente diferentes, mas a variação de cor na maioria amostras não foi perceptível ao olho humano. Em geral, ao comparar os municípios do estudo Lapa e São João do Triunfo foram os locais com maior quantidade de nutrientes, e Bituruna, Cruz Machado e Caçador foram os menores. Os municípios

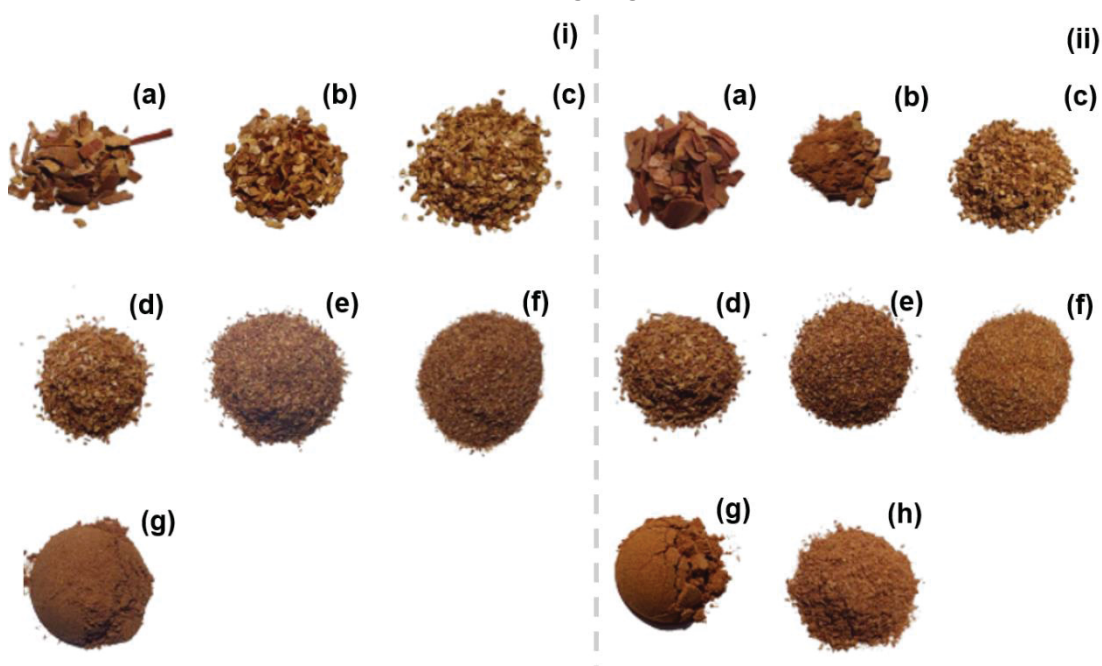
mais próximos tiveram alguns parâmetros semelhantes que podem estar associados ao clima, solo, altitude, e temperaturas anuais e médias. Essas variações não impediram sua aplicação como matéria-prima para alimentos produtos, porém podem servir como diferenciais para a elaboração de diferentes produtos conforme a origem do pinhão. Dessa maneira, avaliar variações em sua composição é relevante ao desenvolvimento de diversos produtos, além de destacar a importância do seu consumo na dieta. Torna-se uma alternativa para vegetarianos e veganos, já que as sementes de pinhão têm um alto conteúdo de carboidratos, que contêm principalmente amido total e significativa quantidade de amido resistente e beneficia a saúde humana. Além do mais, é fonte de fibra alimentar e minerais e contribui para a ingestão diária recomendada de fibra alimentar total (25,85%), Cu (42,2%), P (31,1%), K (23,5%), e Zn (22,1%). E fornece uma média de 8,04% de carboidratos, 5,07% de proteínas e 0,84% de lipídios de os nutrientes diários para uma dieta saudável.

4.2 EXTRATOS BIOATIVOS DA SEMENTE DE PINHÃO (*Araucaria angustifolia*), APLICAÇÃO EM IOGURTE E BIOACESSIBILIDADE APÓS DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

4.2.1 Distribuição do tamanho de partícula

O pinhão após a secagem e descasque apresentou $66,57 \pm 0,10\%$ de semente, $30,70 \pm 0,49\%$ de casca e $2,54 \pm 0,24\%$ de descarte, realizado em quadruplicata. A moagem das cascas rendeu $87,88 \pm 1,69\%$ de fragmentos inferiores a 22,6 mm (20 Mesh) e $2,00 \pm 0,05\%$ superiores, sendo que houve uma perda de 10% devido a retenção no moinho e geração de pó fino succionado por equipamento de proteção coletiva, entre outras.

FIGURA 14 - FRAÇÕES OBTIDAS NAS DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHO DE PARTÍCULA DA CASCA

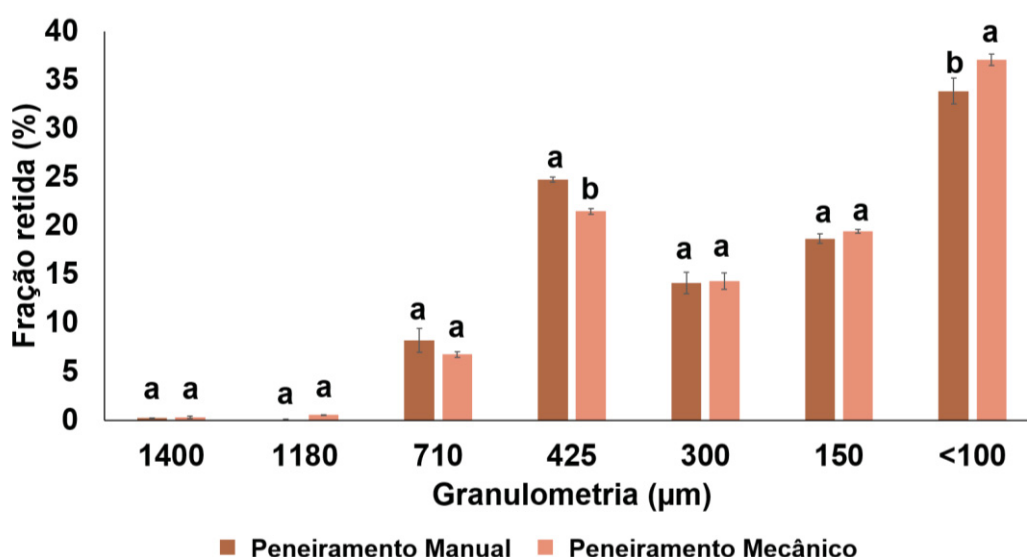


FONTE: A autora (2021).

Peneiramento manual (I) e mecânico (II). Fração retida nas malhas de abertura (μm): (A) $1400 \mu\text{m}$, $d > 1400 \mu\text{m}$; (B) $1180 \mu\text{m}$, dm: $1290 \mu\text{m}$; (C) $710 \mu\text{m}$, dm: $945 \mu\text{m}$, (D) $425 \mu\text{m}$, dm: $567 \mu\text{m}$; (E) $300 \mu\text{m}$, dm: $362 \mu\text{m}$; (F) $150 \mu\text{m}$, dm: $225 \mu\text{m}$; (G) $<100 \mu\text{m}$, dm: $75 \mu\text{m}$; (H) amostra original. D: diâmetro de partícula; dm: diâmetro médio de partícula.

Após a moagem, o tamanho de partícula das amostras de casca foi distribuído por peneiramento manual ou mecânico (Figura 14 e 15). Em ambos os métodos de peneiramento as frações foram retidas majoritariamente entre diâmetro de abertura de 710 a <100 μm . Houve distribuição diferente ($p < 0,05$) somente nas frações retidas em 425 e <100. Essas diferenças entre tipo de agitação são possivelmente devido à falta de padronização pelo peneiramento manual. Considerando que apenas duas das sete granulometrias obtidas apresentaram diferença significativa, o peneiramento manual pode ser utilizado como uma alternativa para pequenas indústrias que não possuem a agitação mecânica.

FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MÉDIA DE CASCA DE PINHÃO (%) COM PENEIRAMENTO MANUAL E MECÂNICO



FONTE: A autora (2021).

Abertura das malhas (μm): **1400 μm** , d > 1400 μm ; **1180 μm** , dm: 1290 μm ; **710 μm** , dm: 945 μm , **425 μm** , dm: 567 μm ; **300 μm** , dm: 362 μm ; **150 μm** , dm: 225 μm ; **<100 μm** , dm: 75 μm . d: diâmetro de partícula; dm: diâmetro médio de partícula. As letras sobrescritas são os dados estatísticos de Tukey, onde as mesmas letras não diferem entre os métodos de peneiramento ($p < 0,05$).

4.2.2 Maximização de compostos fenólicos extraídos de casca de pinhão por Infusão e Shaker

O tamanho de partícula, o solvente e a técnica de extração influenciaram significativamente o conteúdo de compostos bioativos e a atividade antioxidante dos extratos da casca de pinhão, corroborando com o (DESTRO, 2019; TORMENA et al., 2019). De acordo com as respostas (rendimento e fenóis) observadas para os 11

ensaios da extração de casca de pinhão pelo método de Infusão na Tabela S5 e os 19 ensaios pelo método de Shaker na Tabela S6, os valores de rendimento medidos variaram de 60 a 84% para extração com os tamanhos de partícula (G) de 225 e 567 μm com 4,17% S/S, por 30 min para o método de extração por Infusão e por 15 e 45 min em 25 °C para o Shaker. Os valores de fenólicos observados variaram de 25 a 70 mg EAG/g pelo método de extração por Infusão e de 36 a 98 mg EAG/g pelo Shaker. Os maiores valores de fenólicos foram observados para extração com os tamanhos de partícula (G) de 225 μm com 4,17% S/S por 30 min para Infusão e por 45 min em 50 °C para Shaker.

A análise de regressão múltipla dos valores de fenólicos (Tabela S7) mostrou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$), não apresentou falta de ajuste ($p = 0,132$ para Infusão e $p=0,01$ para Shaker) e poderia explicar 99,21% para Infusão e 97,19% para Shaker de todas as variações nos dados ($R^2_{\text{Infusão}} = 0,99208$ e $R^2_{\text{Shaker}} = 0,97189$).

O coeficiente de regressão linear do G e S/S tiveram um efeito significativamente negativos. O tempo e a interação da granulometria com a porcentagem de sólido em relação ao solvente e com a temperatura aumentaram significativamente a extração dos fenólicos. O modelo previsto pode ser descrito pelas Equações 10 e 11.

$$y = 43,34 - 16,68 G - 2,27 S/S + 3,29 t + 3,79 G * S/S \quad (10)$$

$$y = 62,94 - 18,42G - 1,92S/S + 2,71t + 2,87T + 1,42G * S/S - 1,35 G * T \quad (11)$$

Os resultados ótimos para o método de extração de compostos bioativos por Infusão foram obtidos por um menor granulometria da casca de pinhão, proporção de sólidos em relação ao solvente, em maior tempo (condição I5) e, para o método de Shaker, com a maior temperatura (condição S13). Esse efeito de granulometria e proporção de sólidos/solvente já foi relatado anteriormente, pois esse aumento de sólidos reduz a extração de fenólicos, pois o aumento do conteúdo de sólidos leva a uma dificuldade de transferência de massa, que diminui a extração (SANTOS et al., 2018). O aumento da temperatura está associado ao aumento do coeficiente de difusão do solvente líquido dentro da matriz sólida, favorecendo a extração de compostos bioativos (HERRERO et al., 2005).

TABELA 7 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE PINHÃO POR INFUSÃO (I) 2³ E SHAKER (S) 2⁴.

Ensaio	Níveis (Valores reais)				Respostas
	G (µm)	S/S (%m/v)	t (min)	T (°C)	Fenólicos (mg EAG/g, bs)
<i>Infusão</i>					
I1	225	4,17	5		63,99 ± 0,86
I2	567	4,17	5		25,65 ± 0,29
I3	225	12,5	5		48,29 ± 1,01
I4	567	12,5	5		25,22 ± 0,10
I5	225	4,17	30		69,65 ± 1,15
I6	567	4,17	30		26,11 ± 0,43
I7	225	12,5	30		61,10 ± 2,03
I8	567	12,5	30		35,63 ± 0,53
I9	362	8,33	17,5		41,34 ± 0,36
I10	362	8,33	17,5		42,81 ± 1,15
I11	362	8,33	17,5		39,97 ± 0,80
<i>Shaker</i>					
S1	225	4,17	15	25	75,24 ± 1,62
S2	567	4,17	15	25	45,03 ± 0,55
S3	225	12,5	15	25	75,96 ± 0,46
S4	567	12,5	15	25	35,76 ± 0,76
S5	225	4,17	45	25	80,57 ± 0,91
S6	567	4,17	45	25	45,52 ± 0,36
S7	225	12,5	45	25	76,20 ± 1,83
S8	567	12,5	45	25	45,09 ± 0,43
S9	225	4,17	15	50	83,97 ± 3,11
S10	567	4,17	15	50	40,82 ± 1,19
S11	225	12,5	15	50	78,86 ± 0,12
S12	567	12,5	15	50	45,06 ± 2,41
S13	225	4,17	45	50	98,48 ± 5,30
S14	567	4,17	45	50	48,11 ± 0,36
S15	225	12,5	45	50	80,46 ± 0,61
S16	567	12,5	45	50	49,58 ± 0,55
S17	362	8,33	30	37,5	62,09 ± 0,52
S18	362	8,33	30	37,5	64,12 ± 1,01
S19	362	8,33	30	37,5	65,00 ± 0,46

FONTE: A autora (2021).

I9, I10 e I11; S17, S18 e S19: repetições do ponto central; G: granulometria média; S/S: porcentagem de sólidos em relação ao solvente; t: tempos de extração; T: temperatura de extração; bs: base seca.

A repetibilidade da melhor condição de cada extração (I5 e S13) foi avaliada (Tabela S8), e os resultados mostraram não haver diferenças significativas em relação à quantidade de fenólicos ($p < 0,05$). O método de extração por Infusão apresentou ~66 mg EAG/g de casca, enquanto o método de extração por Shaker apresentou ~94

mg EAG/g de casca, apresentando aumento de 42% em relação ao método por Infusão.

4.2.3 Comparação dos métodos maximizados com o convencional

4.2.3.1 Recuperação e compostos bioativos

O rendimento da recuperação do extrato e conteúdo de compostos bioativos dos extratos maximizados (Infusão e Shaker) sob as melhores condições fenólicas e do extrato controle de Soxhlet (Tabela 8) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). A extração por Soxhlet além de não requerer centrifugação, apresentou o maior rendimento entre os métodos de extração e foi 1,7 vezes maior em fenólicos que o extrato maximizado obtido por Shaker e 2 vezes maior que o extrato obtido por Infusão ($p < 0,05$). Apenas o potencial antioxidante por FRAP foi maior no método de extração por Shaker do que por Soxhlet ($p < 0,05$), possivelmente com o Shaker os compostos bioativos obtidos têm maior capacidade de quelar o íon ferro. O rendimento de extração de 80% v/v corrobora com estudos anteriores para extratos obtidos de pinhão de separação por membrana (SANTOS et al., 2018).

TABELA 8 - ANÁLISE DE RENDIMENTO E COMPOSTOS BIOATIVOS PARA OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CASCA DE PINHÃO

Parâmetros	Infusão	Shaker	Soxhlet
Rendimento (%v/v)	82,73 $\pm$ 1,27 ^b	82,80 $\pm$ 1,57 ^b	89,00 $\pm$ 0,01 ^a
Fenólicos (mg EAG/g)	66,89 $\pm$ 3,30 ^c	93,11 $\pm$ 5,56 ^b	137,68 $\pm$ 2,77 ^a
Flavonoides (mg EC/g)	69,94 $\pm$ 2,42 ^c	77,88 $\pm$ 6,56 ^b	101,34 $\pm$ 2,85 ^a
Taninos (%)	23,23 $\pm$ 0,88 ^c	25,27 $\pm$ 0,81 ^b	33,10 $\pm$ 0,95 ^a
Fitoesteróis (mg β -sit/g)	0,97 $\pm$ 0,13 ^c	1,35 $\pm$ 0,06 ^b	2,32 $\pm$ 0,04 ^a
ABTS (μ mol ET/g)	662,97 $\pm$ 39,02 ^c	858,37 $\pm$ 119,16 ^b	1091,21 $\pm$ 138,76 ^a
DPPH μ mol ET/g)	500,67 $\pm$ 9,53 ^c	732,48 $\pm$ 5,62 ^b	1002,79 $\pm$ 30,69 ^a
FRAP (μ mol ET/g)	11,98 $\pm$ 0,97 ^c	21,21 $\pm$ 1,48 ^a	16,22 $\pm$ 1,28 ^b

FONTE: A autora (2021).

Média das repetições $\pm$ desvio padrão; sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre amostras diferentes na mesma linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os experimentos em granulometria com diâmetro médio de 225 μ m, porcentagem sólidos em relação ao solvente 4,17%; Shaker, S13 (45 min, 50 °C); Infusão, I5 (30 min, T ebulição); Soxhlet (6 h, T ebulição). Análise realizada em extrato líquido, valores em base seca de casca.

Resultados semelhantes dos compostos bioativos foram relatados para Soxhlet anteriormente (BELLATTO; BRAGUINI, 2020; LIMA et al., 2020). Além disso, variações foram atribuídas às diferentes proporções de soluções hidroalcólicas e a metodologia. A extração hidroalcólica de 25% apresentou 1,7 vezes mais flavonoides e 11 vezes mais taninos que a extração aquosa para casca (BELLATTO; BRAGUINI, 2020), mas no presente estudo, a extração com etanol puro promoveu 2,3-3,3 vezes mais taninos que a citada trabalhos.

Segundo estudos anteriores, a presença de taninos condensáveis no extrato está relacionada a um inibidor eficaz da lipase pancreática (OLIVEIRA et al., 2015) e da alfa-amilase (SILVA et al., 2014). Esses achados são consistentes com seu potencial antiobesidade, conforme sugerido para outros polifenóis ou preparações ricas em taninos (SILVA et al., 2014).

O potencial antioxidante dos extratos obtidos no presente estudo, com etanol pa como solvente e casca seca (sem cozimento) foi maior em 41 vezes para atividade antioxidante por ABTS, 110 vezes por DPPH e 10 vezes por FRAP do que a extração da casca cozido com uma solução hidroalcólica (80%) (DE FREITAS et al., 2018). Essas informações corrobora com estudos anteriores, no qual sugere que o processo de cozimento do pinhão com a casca reduz drasticamente o potencial antioxidante da casca, devido à migração dos compostos bioativos para a semente e água de cozimento (CORDENUNSI et al., 2004).

Os fenólicos exibiram correlação de Spearman positiva ($> 0,87$) ($p < 0,05$) com atividade antioxidante por ABTS e DPPH, flavonoides e taninos. No entanto, os extratos foram negativamente correlacionados com a cor L^* e b^* , portanto quanto mais fenólicos extraídos, mais escuro ($-L^*$) e tendência azulada ($-b^*$) ocorre.

Os conteúdos de fitosteróis totais dos extratos variaram de 0,97-2,32 mg β -sitosterol/g de casca, valores inferiores aos obtidos para casca bruta utilizado nas extrações (7,11 mg β -sitosterol/g de casca). O rendimento dos extratos em pó foi de 8,26% para Infusão, 11,27% para Shaker e 17,12% para Soxhlet. Um estudo anterior revelou quantidades significativas de fitoesteróis, tais como β -sitosterol e campesterol, bem como inferior de estigmasterol em nanossuspensões de casca por CG/MS. Neste estudo, a casca exibiu quantidades significativas de β -sitosterol e campesterol por GC/MS. O β -sitosterol é um dos fitoesteróis mais comuns e se assemelha estruturalmente ao colesterol, o que é considerado como um agente terapêutico para

reduzir os níveis séricos de colesterol e suprimir a absorção de colesterol (MATSUOKA et al., 2008).

Os compostos bioativos apresentaram altos valores para o método de extração por Soxhlet, que estão relacionados à característica de extração, empregando refluxo contínuo, facilitando o processo de transferência de massa (ZHANG; LIN; YE, 2018). No geral, a seleção do tempo de extração reduz custos e evita a degradação de compostos bioativos (ALARA; ABDURAHMAN, 2019). Tempos mais longos, em temperaturas elevadas, podem causar degradação térmica devido a reações de oxidação, decomposição e polimerização de compostos fenólicos (ALONSO-CARRILLO et al., 2017). Todavia, no presente estudo, o melhor desempenho ocorreu em um tempo maior (6 h), indicando que esta matriz possui compostos mais termorresistentes nas condições analisadas.

4.2.3.1 Cromatografia gasosa da casca de pinhão seca

A casca na granulometria utilizada para as extrações dos compostos bioativos foi caracterizada por GC-MS. Setenta compostos foram identificados, dos quais 43 eram hidrofílicos e 27 eram lipofílicos (Tabelas S9 e S10). Corroborando com estudo anterior, na qual houve maior quantidade de grupos hidrofílicos em relação aos grupos lipofílicos, bem como uma maior quantidade de compostos lipofílicos do que os hidrofílicos, porém, a maioria desses já foi identificada em estudo anterior com a mesma matriz (LIMA et al., 2020).

Desses compostos identificados, 13 classes foram atribuídas aos compostos hidrofílicos e apenas 7 classes resultaram em margem efetiva ($>0,1$ mg/g); enquanto que, para compostos lipofílicos, todas as classes resultaram em margem efetiva. As classes de compostos hidrofílicos que apresentaram as maiores concentrações foram os aromáticos; açúcares, apresentou sacarose (0,98 mg/g), frutose (0,80 mg/g) e glicose (0,51 mg/g); álcoois de açúcar, eritritol (0,50 mg/g) e manitol (0,35 mg/g); fenóis, catequina (1,36 mg/g), ácido protocatecúico (0,37 mg/g) e epicatequina (0,37 mg/g) e quercetina (0,30 mg/g), ciclitol, D-Pinitol (0,30 mg/g) e amido, ureia (0,11 mg/g). As demais classes e compostos apresentaram valores inferiores a 0,10 mg/g.

A ação antioxidante dos extratos se deve principalmente à presença de hidroxilas de compostos fenólicos, essenciais para a atividade antioxidante. A atividade antioxidante ocorre devido à estrutura dos compostos fenólicos, poder tornar

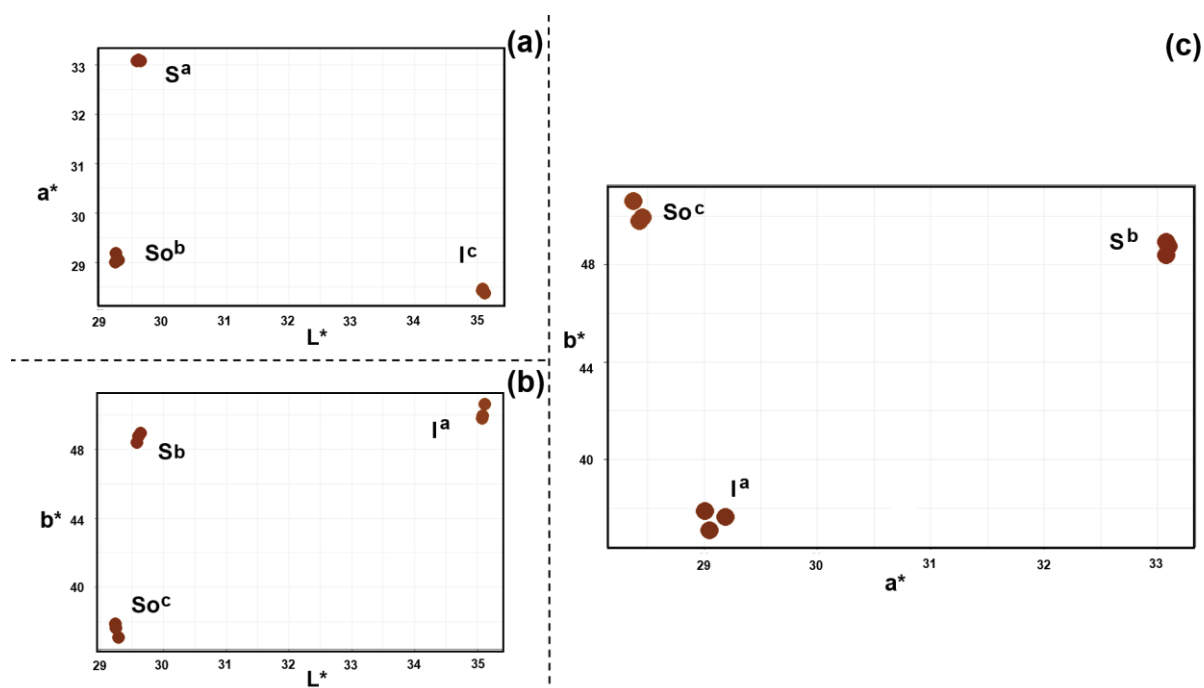
o radical formado resiliente após a ressonância dos radicais livres (ZHAO et al., 2018). Estudos recentes têm demonstrado que os filmes com nanopartículas do tegumento do pinhão podem ser aplicados nas mais diversas áreas como tratamento de feridas, produção de sistemas de liberação controlada de fármacos e andaimes para engenharia de tecidos, possuindo enorme potencial na área biomédica, atribuído aos níveis de catequina e quercetina (DE LIMA et al., 2022).

A classe dos esteróis foi a que apresentou maior quantidade de compostos, com valor médio de 10,39 mg/g. Seus compostos são o campesterol (1,7 mg/g) e o β -sitosterol, com 19 mg/g. As demais classes apresentaram valor médio inferior a 1,2 mg/g, como diterpeno, α -hidroxiácido, ácido carboxílico e triterpeno. O β -sitosterol é um dos fitoesteróis mais abundantes, e é considerado um complemento nutricional seguro em alimentos com vários benefícios farmacológicos (BIN SAYEED et al., 2016). Além dos efeitos conhecidos como anticâncer, antioxidante, antibacteriano, efeitos anti-inflamatórios, imunomodulatório, angiogênico, antidiabético, antinociceptivo, (AMBAVADE; MISAR; AMBAVADE, 2014). Pode ainda ser utilizado no tratamento de doenças inflamatórias alérgicas incluindo dermatite atópica (HAN; KIM; JEONG, 2014), em cosméticos, como protetores solares, hidratantes, sabonetes líquidos e produtos anti-envelhecimento (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

4.2.3 Componentes colorimétricos $L^* a^* b^*$

Os extratos obtiveram parâmetros de cor significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 16). O parâmetro L^* indicou que era ~20% mais leve que Shaker e Soxhlet. Shaker mostrou-se mais avermelhado ($+a^*$) do que Infusão e Soxhlet, enquanto Infusão e Shaker eram ~33% mais amarelos do que Soxhlet. Todas as amostras apresentaram diferença perceptível ao olho humano ($\Delta E > 2$) (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975): (Infusão *versus* Shaker: 7,34; Infusão *versus* Soxhlet: 13,38; Shaker *versus* Soxhlet: 11,85). A menor diferença foi observada entre Infusão e Shaker. A maior diferença obtida por Soxhlet deveu-se ao maior tempo de extração (6 h), quando comparado a menos de 1 h de Infusão e Shaker, temperatura de extração e sem contato direto com a fonte quente. Uma vez que o tamanho de partícula e a proporção de solvente sólido foram os mesmos nos três métodos.

FIGURA 16 - COMPARAÇÃO DA COR DOS EXTRATOS MAXIMIZADOS EM RELAÇÃO AO MÉTODO CONVENCIONAL



FONTE: A autora (2021).

I: extrato maximizado obtido por infusão; S: extrato maximizado obtido por Shaker; So: extrato obtido por Soxhlet. (a) Parâmetro de cor a^* versus L^* , com estatística de b. (b) Parâmetro de cor b^* versus L^* , com estatística de a. (c) Parâmetro de cor a^* versus b^* , com estatística de L. Tukey teste ($p < 0,05$).

4.2.4 Ensaio de toxicidade por incubação de *Artemia salina*

O teste de toxicidade da *Artemia salina*, ou teste de letalidade, foi conduzido para sugerir indiretamente a quantidade máxima de extrato que poderia ser adicionada ao iogurte sem prejudicar as culturas vivas do iogurte. A *A. salina* é uma espécie sensível e tem demonstrado eficácia na relação entre a toxicidade de extratos vegetais para consumo humano (BELLATTO; BRAGUINI, 2020). Adicionalmente, tem sido utilizado como teste para produtos naturais com potencial atividade farmacológica, estabelecendo limites de concentração (BELLATTO; BRAGUINI, 2020). Estudos recentes mostram que o ensaio com a *A. salina* é eficaz e pode agilizar experimentos de toxicidade, diminuir custos, podendo ser considerada uma alternativa ao ensaio de cultura de células *in vitro* (PALÁCIO et al., 2021; RAJABI et al., 2015).

Os resultados do teste de letalidade, toxicidade, mostraram que em concentrações até 10 µg/mL de extrato, não houve mortes de espécimes, e em 500 µg/mL de extrato, ocorreu 100% de letalidade. A LC50 (concentração que causaria 50% de letalidade da *Artemia salina*) para os extratos variou de 100 a 250 µg/mL, indicando toxicidade média. Em 250 µg/mL, a extração por Shaker atingiu a LC50, enquanto a extração por Infusão e Soxhlet estiveram próximos de 90% de letalidade, com valores semelhantes e diferentes de por Shaker ($p < 0,05$).

O melhor ajuste, obtido por uma equação polinomial (BELLATTO; BRAGUINI, 2020) mostra que a LC50 variou de 165 µg/mL a 250 µg/mL, com R^2 de 0,93 a 0,95, portanto os extratos apresentaram toxicidade média (LC50 de 100-500 µg/mL¹) (CLARKSON et al., 2004). Portanto, de acordo com trabalhos anteriores, o extrato de da casca de pinhão pode ser empregado como alimento ou campo de entrega de drogas, mas deve ser usado dentro dos limites de concentração seguros (BELLATTO; BRAGUINI, 2020).

A toxicidade dos extratos correlacionou-se significativamente ($p < 0,05$) com os valores de fitosteróis e potencial antioxidante por FRAP, e com o parâmetro de cor a^* . As correlações de Spearman variaram entre -0,63 e -0,75, indicando que amostras com menor quantidade de fitoesteróis e potencial antioxidante por FRAP, e mais avermelhadas ($+a^*$), foram menos tóxicas. As variações de cerca de 56% na toxicidade dos extratos foram devidas à temperatura de extração. Portanto, os métodos de extração estudados extraem parcialmente os compostos.

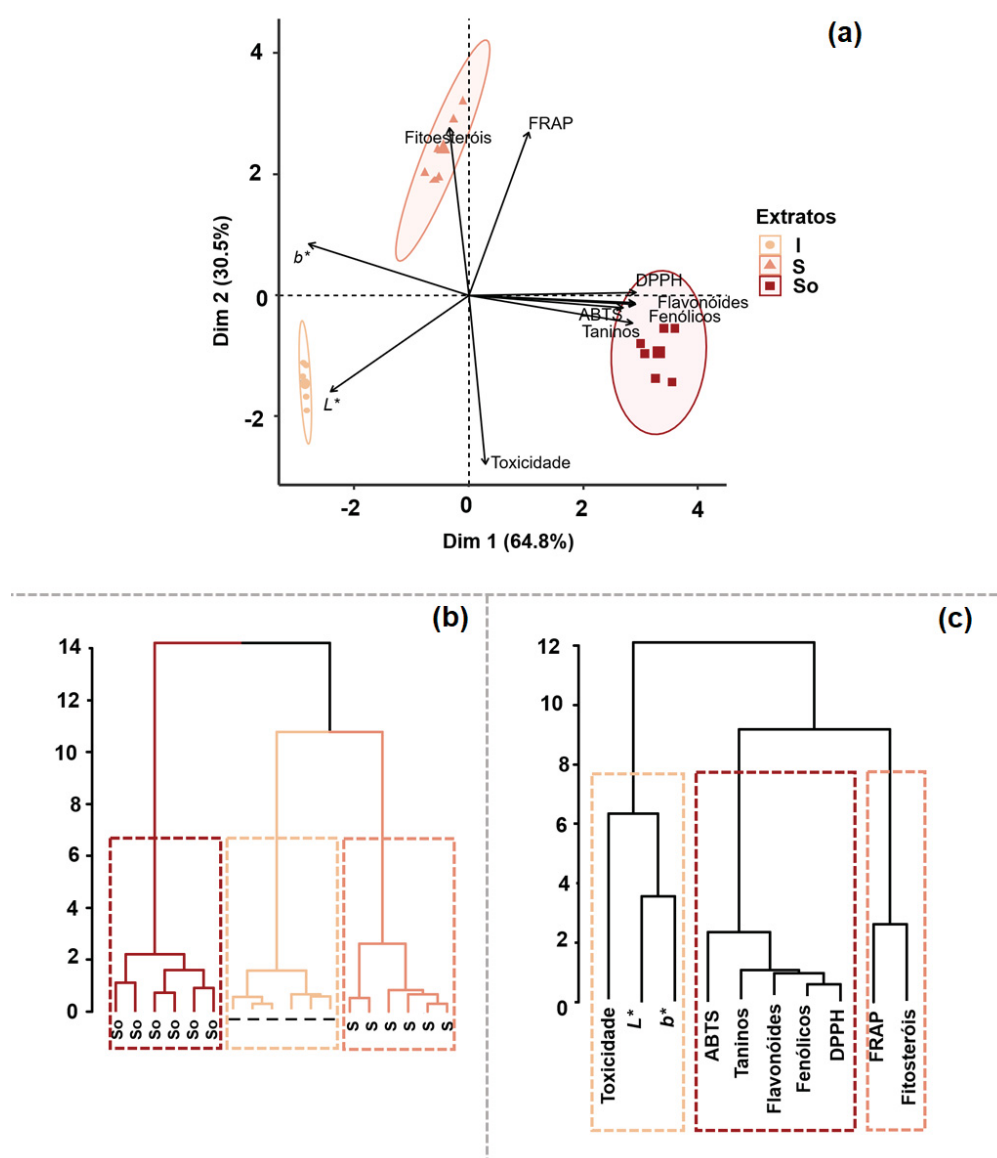
Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os obtidos anteriormente, utilizando a mesma matéria-prima e extrato etanólico 25% (BELLATTO; BRAGUINI, 2020). Assim, além de sugestões de aplicação de ração para peixes, camarões, material adsorvente para antibióticos e fármacos (BELLATTO; BRAGUINI, 2020); Os extratos de casca de pinhão podem ser incorporados em produtos alimentícios para humanos e fornecem uma quantidade significativa de fenólicos e flavonoides, além de potencial antioxidante.

4.2.5 Componentes principais e cluster de extrações maximizadas por Soxhlet

O PCA (Figura 17) foi usado para resumir a extração de compostos bioativos presentes nos diferentes métodos de extração Infusão, Shaker e Soxhlet. O parâmetro de cor " a^* " foi retirado da análise por apresentar $P=0,432$; enquanto os demais

parâmetros apresentaram ($p > 0,54$). A PCA explicou 95,3% da variação total entre os diferentes métodos de extração. Ao avaliar o PCA Biplot, juntamente com o agrupamento de variáveis (Figura 17, A e C), verificou-se que os extratos apresentaram características distantes entre si. Os parâmetros mais importantes de cada extrato foram FRAP e fitosteróis para Shaker; enquanto ABTS, taninos, flavonoides, fenólicos e DPPH para Soxhlet; a toxicidade ficou entre a extração por Soxhlet e Infusão, enquanto os parâmetros de cor L^* e b^* foram para Infusão.

FIGURA 17 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE PINHÃO PELOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO



FONTE: A autora (2021).
Métodos de extração por Infusão (I); Shaker (S); Soxhlet (So).

A Figura 17 B mostra a presença de dois grupos principais, enquanto um deles é dividido em dois menores. A extração por Soxhlet foi a mais diferente, e esteve em um único cluster, enquanto Shaker e Infusão foram as mais próximas.

Em relação aos métodos de extração, os extratos obtidos por Soxhlet promoveram a maior quantidade de compostos bioativos (BELLATTO; BRAGUINI, 2020; LIMA et al., 2020). Contudo, esta técnica requer equipamentos específicos e tempos de extração mais longos. O uso de agitador, como por exemplo pelo método por Shaker beneficia a indústria em termos de energia, tempo e custo e é comumente utilizado (OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2014). A extração por Infusão requer menos energia, pois o processo necessita apenas de aquecimento do solvente e após verter o solvente na matriz, é conduzido em temperatura ambiente e sem agitação. Considerando as características de menor toxicidade e custo-efetividade, o método de extração por Shaker foi selecionado para aplicação em iogurte.

4.2.6 Adição de extrato em iogurte

4.2.6.1 Vida útil dos iogurtes

Em um estudo preliminar, a adição de 25 e 50 mg de extrato em 100 g de iogurte comercial não apresentou nenhuma variação na acidez e pH entre as formulações adicionadas de extrato ($p < 0,05$). Entretanto, após 30 dias de armazenamento houve um aumento na acidez do iogurte ($p < 0,05$), enquanto que o adicionado de extrato nas duas concentrações foi igual ($p > 0,05$). A cor das amostras adicionadas de extrato apresentou uma variação perceptível ($\Delta E > 2$), à medida que, a concentração do extrato aumentou. O conteúdo de fenólicos totais aumentou gradativamente com a adição do extrato; entretanto, a adição de 25 ou 50 mg não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados de vida útil dos iogurtes padrão e do adicionado de extrato (25 mg/100 g de iogurte), obtidos pelo método de extração por Shaker, (Tabela 9 e Figura 18) mostram que as formulações de iogurte no tempo inicial, zero dia, foram estatisticamente diferentes pelo teste T ($p < 0,05$), exceto para flavonoides ($p > 0,05$). Após 30 dias de armazenamento refrigerado, houve redução de 29% no conteúdo de flavonoides do iogurte com o extrato, pelo teste T pareado ($p < 0,05$), e assim, esses compostos também apresentaram diferença significativa entre o iogurte padrão, pelo

teste T ($p < 0,05$). A adição de extrato no iogurte melhorou significativamente as quantidades de compostos bioativos medidos pelos fenólicos totais e o potencial antioxidante para os mecanismos de ABTS, DPPH e FRAP em ambos os dias ($p < 0,05$), exceto para o conteúdo de flavonoides. O extrato aumentou a concentração de compostos bioativos no tempo 0 dia em 20-120% e na 70 a 190% após 30 dias.

TABELA 9 - ANÁLISE DA VIDA ÚTIL DOS IOGURTES ADICIONADOS DE EXTRATO DA CASCA DO PINHÃO (ECP)

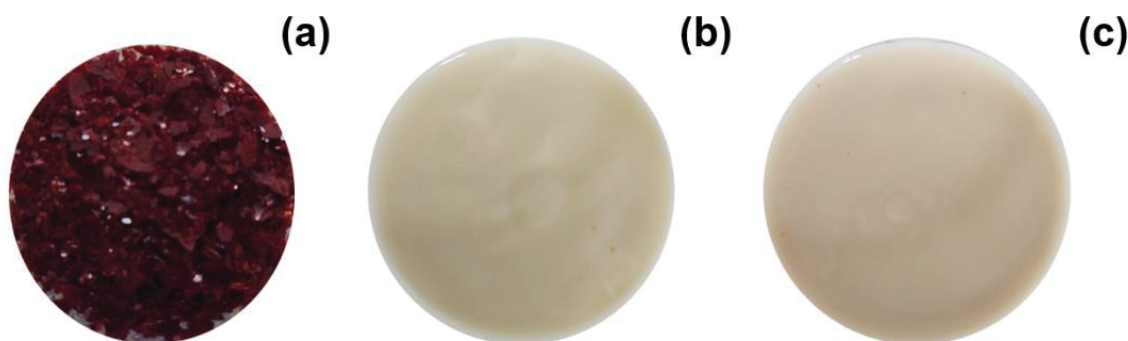
Parâmetros	Formulações de iogurte	0 dia	30 dias
Fenólicos (mg EAG/100 g)	Padrão	$1,28 \pm 0,08^{Ab}$	$1,14 \pm 0,05^{Ab}$
	Padrão + ECP	$2,41 \pm 0,17^{Ba}$	$3,34 \pm 0,08^{Aa}$
Flavonoides (mg EC/100 g)	Padrão	$32,20 \pm 4,24^{Aa}$	$35,19 \pm 3,15^{Aa}$
	Padrão + ECP	$38,19 \pm 0,92^{Aa}$	$27,20 \pm 0,53^{Bb}$
ABTS ($\mu\text{mol ET/ 100 g}$)	Padrão	$696,78 \pm 0,48^{Bb}$	$771,01 \pm 19,74^{Bb}$
	Padrão + ECP	$838,09 \pm 55,41^{Ba}$	$1325,67 \pm 20,14^{Aa}$
DPPH ($\mu\text{mol ET/ 100 g}$)	Padrão	$76,25 \pm 2,97^{Ab}$	$76,93 \pm 2,11^{Aa}$
	Padrão + ECP	$164,50 \pm 14,35^{Aa}$	$181,10 \pm 18,61^{Ab}$
FRAP ($\mu\text{mol ET/ 100 g}$)	Padrão	$0,00 \pm 0,00^b$	$0,00 \pm 0,00^{Aa}$
	Padrão + ECP	$113,21 \pm 3,20^{Aa}$	$0,00 \pm 0,00^{Ba}$
L^*	Padrão	$96,38 \pm 0,02^{Aa}$	$93,87 \pm 0,02^{Ba}$
	Padrão + ECP	$93,11 \pm 0,01^{Ab}$	$90,88 \pm 0,01^{Bb}$
a^*	Padrão	$-1,29 \pm 0,03^{Aa}$	$-1,47 \pm 0,02^{Ba}$
	Padrão + ECP	$1,15 \pm 0,03^{Ab}$	$1,13 \pm 0,03^{Ab}$
b^*	Padrão	$10,88 \pm 0,03^{Aa}$	$10,62 \pm 0,03^{Aa}$
	Padrão + ECP	$9,56 \pm 0,03^{Bb}$	$9,63 \pm 0,03^{Ab}$
ΔE	Padrão	-	$2,52 \pm 0,02$
	Padrão + ECP	$4,28 \pm 0,03$	$2,23 \pm 0,01$

FONTE: A autora (2021).

Valores para 100 g de iogurte em base seca. Letras maiúsculas: comparação de cada amostra ao longo do tempo. Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste T pareado ($p < 0,05$). Letras minúsculas: comparação de formulações em cada dia. Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste T ($p < 0,05$).

Diferenças significativas foram evidenciadas entre as formulações ($p < 0,05$) e ao longo do tempo ($p < 0,05$), exceto para a^* do iogurte com extrato. A adição do extrato ao iogurte aumentou os valores de a^* (maior tendência ao vermelho) e diminuiu o valor de b^* (menor tendência ao amarelo) e a luminosidade. Os compostos que apresentaram coloração vermelha para os extratos mostraram-se estáveis. A variação $\Delta E > 2$ entre as formulações já era esperada, mas a variação ΔE no iogurte ao longo do tempo de armazenamento foi de 2, considerada não perceptível ao olho humano ($\Delta E > 2$) (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975).

FIGURA 18 - EXTRATO BIOATIVO DE CASCA DE PINHÃO E IOGURTES



FONTE: A autora (2021).

Extrato bioativo de casca de pinhão (a); iogurte padrão (b); iogurte adicionado de extrato (c).

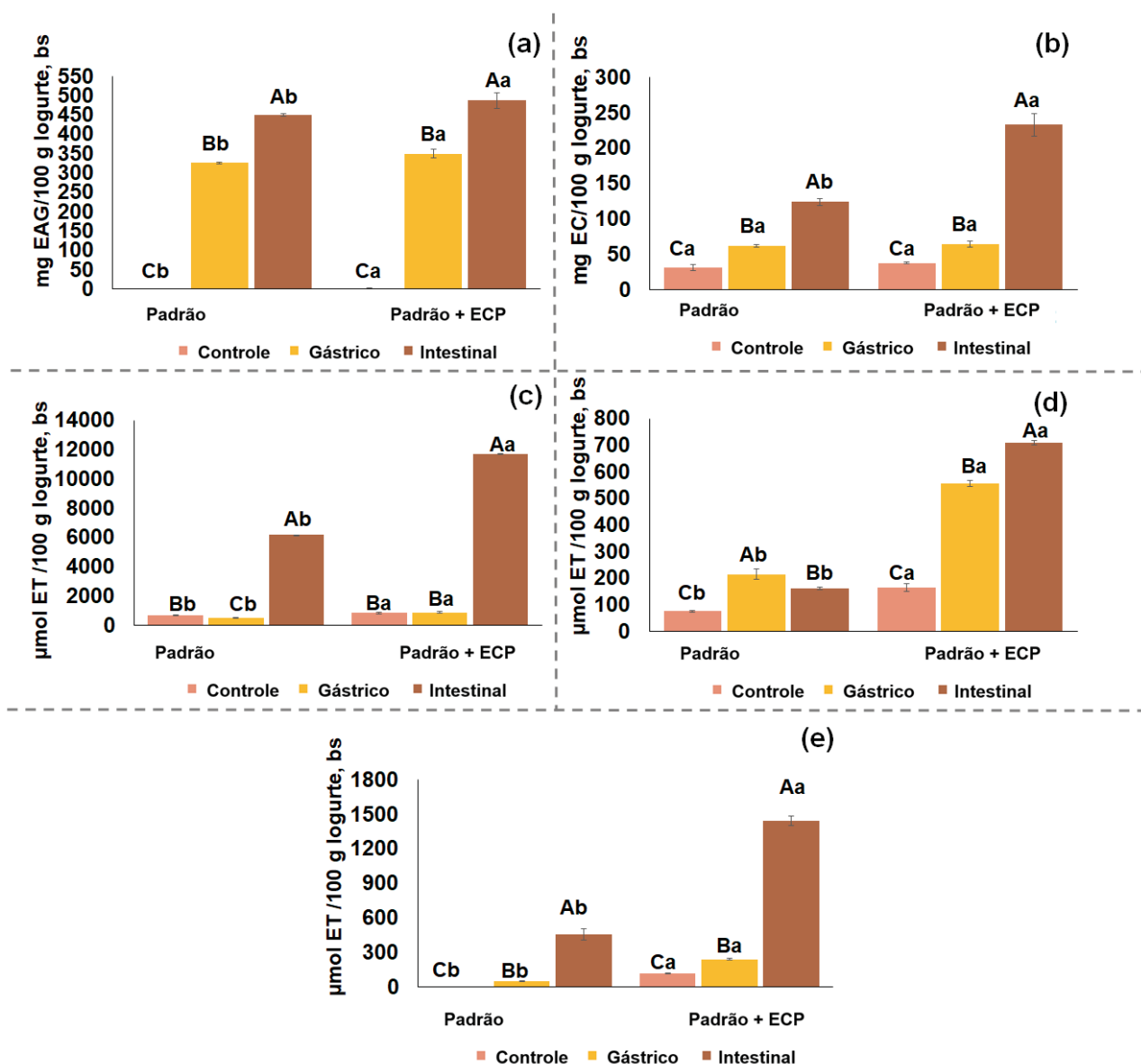
4.2.6.2 Digestibilidade gastrointestinal *in vitro* dos iogurtes

Os resultados de digestibilidade para os compostos bioativos mostrados na Figura 19, e em detalhes na Tabela S11, indicaram que a adição do extrato ao iogurte contribuiu para um aumento significativo ($p < 0,05$) de digestibilidade dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante, com valores médios de 61% para o controle (não digerido), 135% na fase gástrica e 149% na fase intestinal. Após a digestão, os iogurtes apresentaram alta bioacessibilidade de compostos fenólicos e flavonoides, bem como o potencial antioxidante, sendo maior na fase intestinal ($p < 0,05$). Alterações físico-químicas no trato gastrointestinal, como temperatura, pH e enzimas afetam a biodisponibilidade de compostos antioxidantes (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2019). O aumento mais significativo foi nos compostos fenólicos, com valores após digestão gastrointestinal 346 e 607 vezes maiores que o controle; os flavonoides foram 5,79 e 7,79 vezes maiores; e as atividades antioxidantes 4,93 e 15,01 vezes, para gástrico e intestinal, respectivamente.

A digestão aumentou a bioacessibilidade dos compostos bioativos do extrato do pinhão inserido em iogurte e, conseqüentemente, aumentou o potencial antioxidante. As variações na digestibilidade de compostos fenólicos e flavonoides em relação a amostras de controle também foram relatadas em estudos anteriores (CORROCHANO et al., 2019; SILVA et al., 2021). Além do mais, os polifenóis são

sensíveis a condições alcalinas, onde uma parte dos compostos pode ser transformada em diferentes formas estruturais com outras propriedades químicas e atividade biológica (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2019).

FIGURA 19 – BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM IOGURTES ADICIONADOS DE EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO



FONTE: A autora (2021).

Fenólicos totais (a); Flavonoides totais (b) e potencial antioxidante ABTS (c), DPPH (d) E FRAP (e). Letras maiúsculas indicam efeito da digestão. Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas: comparação das formulações em cada etapa (Controle, Gástrica e Intestinal). Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste T ($p < 0,05$).

A bioacessibilidade do iogurte padrão pode ser devido às proteínas do soro, como a alfa-lactoalbumina, que possui alta capacidade antioxidante e seu potencial

não apenas é mantido, mas também aumentado na digestão (CORROCHANO et al., 2019). Além disso, estudos anteriores mostraram que as proteínas do leite apresentaram diferenças nos modelos de digestão infantil e adulto. Sendo assim, podem ser influenciadas pelo estágio de vida, bem como pela localização do intestino (JOUBRAN; MOSCOVICI; LESMES, 2015).

4.2.7 Considerações finais

A maximização dos compostos fenólicos dos extratos obtidos pelos métodos de Infusão e Shaker mostrou que o efeito do tamanho de partícula da casca do pinhão foi 7 vezes maior que as demais variáveis e interações. Sendo o primeiro estudo que investigou o efeito do tamanho de partícula da casca do pinhão e a sua aplicação de partículas de tamanhos maiores para o aproveitamento completo das frações com menor custo. A maior obtenção de compostos fenólicos foi em menores tamanhos de partícula (225 μm) e proporção sólido/solvente (4,17%), maior o tempo (30 min por Infusão e 45 min pelo Shaker) e maior temperatura, 50 °C por Shaker. O método de Soxhlet apresentou a maior quantidade de compostos bioativos e potencial antioxidante, seguido de Shaker e Infusão. Essas propriedades bioativas foram atribuídas ao pinhão que apresentam compostos fenólicos com atividade antioxidante como catequina, ácido protocatecúico, epicatequina, quercetina, β -sitosterol e campesterol.

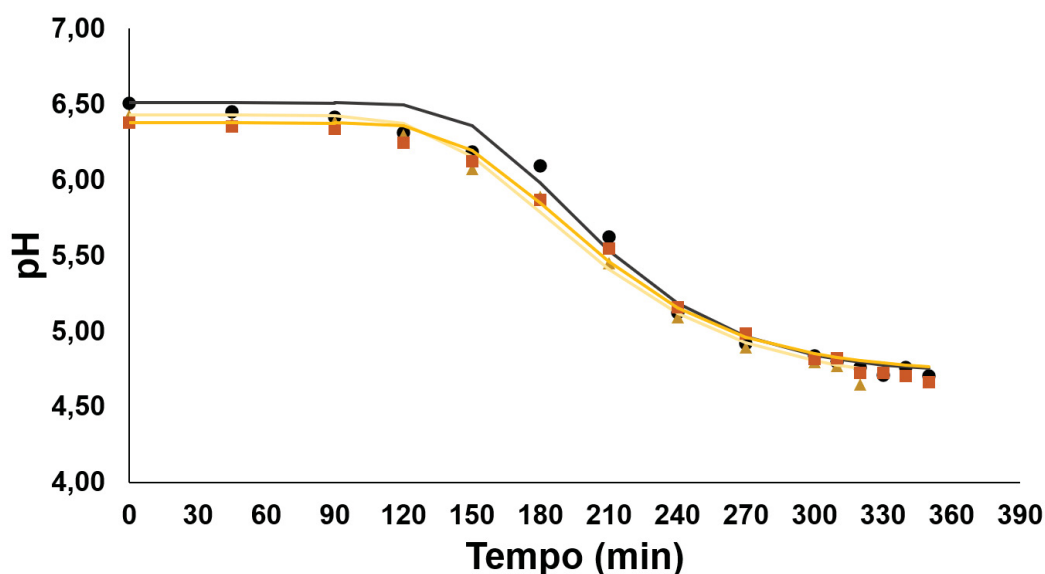
O extrato obtido por Shaker foi utilizado para aplicação em iogurte. A adição do extrato aos iogurtes os tornou avermelhados, aumentou os compostos bioativos ao longo de sua vida útil de 20 para 190%. Após a digestão os iogurtes adicionados de extrato tiveram maior bioacessibilidade do que o iogurte controle, em relação aos fenólicos (346 e 607 vezes), flavonoides (5,79 e 7,79 vezes) e potenciais antioxidantes (4,93 e 15,01 vezes). Os resultados mostram que os três extratos bioativos da casca de pinhão possuem compostos fenólicos e flavonoides, fitoesteróis, que conferem alto potencial antioxidante, sendo também investigado as doses seguras para aplicação em alimentos. Esses achados apresentam um novo produto para o mercado, sendo um potencial destino para valorizar a casca do pinhão, principalmente aplicado em produto lácteo, que até o momento não há aplicações. O extrato da casca do pinhão pode ser utilizado em diversas aplicações e aumentar a vida útil dos produtos.

4.3 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SEMENTE DE PINHÃO EM IOGURTE NA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E ESTABILIDADE POR 30 DIAS

4.3.1 Cinética de fermentação do leite para elaboração de iogurte

As curvas de redução do pH obtidas durante a fermentação do iogurte (Figura 20) mostram que o declínio do pH não foi influenciado pela adição da semente antes da fermentação. Foi necessário 350 min (5,8 h) para o iogurte padrão (SP₀), produzido somente com o leite, atingir o pH final (4,6). Os iogurtes com adição de 5 e 10% de semente antes da fermentação, levaram 5,3 e 5,8 h, respectivamente. As variações de 30 min podem estar associadas com a temperatura no equipamento da fermentação, temperatura de adição da cultura.

FIGURA 20 - REDUÇÃO DO pH DURANTE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO LEITE PARA ELABORAÇÃO DE IOGURTE COM ADIÇÃO DE SEMENTE DE PINHÃO



FONTE: A autora (2022).

Os pontos SP₀ (●), SP₅ (▲) e SP₁₀ (■) representam os valores dos iogurtes experimentais, enquanto as linhas SP₀ (—), SP₅ (—) e SP₁₀ (—) representam os dados obtidos do modelo. SP: semente de pinhão; subscrito 0, 5 e 10 são as quantidades de semente de pinhão (m/m%) em iogurte.

Os dados obtidos foram bem ajustados ao modelo de De Brabandere e Baerdemaeker, com coeficiente de correlação $R^2 > 0,98$. Esse modelo é usado para avaliar indiretamente o crescimento bacteriano por meio do declínio do pH nos

processos de fermentação (DE BRABANDERE; DE BAERDEMAEKER, 1999). Portanto, os comportamentos do declínio do pH das amostras podem ser descritas pelos parâmetros na Equação (3).

Logo em seguida, foram avaliados os parâmetros obtidos pelo modelo, sendo que o parâmetro λ (Tabela 10) representa a fase de latência da cultura de iogurte em o leite, ou seja, o tempo necessário para a adaptação da cultura no leite antes de começar a produzir ácido. A adição de 5% de semente reduziu o tempo de fase lag (h) em 10% ($p < 0,05$), no entanto, ao dobrar a concentração de semente (10%) a fase lag permaneceu igual ($p > 0,05$) ao iogurte padrão. Apesar das variações estatísticas os resultados mostram 15 min de diferença, podendo ser devido as variações de temperatura no processo.

A taxa máxima de redução do pH ocorre entre 5,7 e 5,0, durante o crescimento simbiótico de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (DE BRABANDERE; DE BAERDEMAEKER, 1999). Nesta fase de fermentação, o oxigênio inicial é consumido, ocasionando a redução de pH, com consequente produção de CO₂ e ácido fórmico por *S. thermophilus*, o que estimula o crescimento de *L. bulgaricus* (CHANDAN, 2014). Por outro lado, *L. bulgaricus* hidrolisa proteínas em peptídeos e aminoácidos livres, indispensáveis para o crescimento de *S. thermophilus* (CHANDAN, 2014; TAMIME; ROBINSON, 2007).

TABELA 10 - PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DE GOMPERTZ MODIFICADA ADAPTADA PARA CURVAS DE FERMENTAÇÃO COM REDUÇÃO DO pH EM FORMULAÇÕES DE IOGURTES ADICIONADAS DE 0,5 E 10% DE SEMENTE DE PINHÃO (SP) ANTES DA FERMENTAÇÃO

Parâmetros	SP ₀	SP ₅	SP ₁₀
λ (h)	2,43 $\pm$ 0,06 ^a	2,19 $\pm$ 0,04 ^b	2,34 $\pm$ 0,02 ^a
μ (h ⁻¹)	-0,92 $\pm$ 0,05 ^a	-0,79 $\pm$ 0,04 ^b	-0,81 $\pm$ 0,01 ^b
pH $_{\infty}$ -pH ₀	-1,80 $\pm$ 0,02 ^a	-1,78 $\pm$ 0,02 ^a	-1,66 $\pm$ 0,03 ^b
pH ₀	6,51 $\pm$ 0,01 ^a	6,43 $\pm$ 0,01 ^b	6,38 $\pm$ 0,01 ^c
R ²	0,99	0,99	0,99
Tempo para atingir pH 5 (h)	4,30 $\pm$ 0,04 ^b	4,22 $\pm$ 0,03 ^b	4,46 $\pm$ 0,04 ^a
Tempo do pH 5 ao pH $_{\infty}$ (h)	1,54 $\pm$ 0,04 ^a	1,11 $\pm$ 0,03 ^c	1,37 $\pm$ 0,04 ^b

FONTE: A autora (2022).

Parâmetros: μ , máximo declínio de pH (h⁻¹); λ , tempo da fase lag (h); pH₀, pH inicial; pH $_{\infty}$, pH final.

A adição de semente reduziu significativamente ($p < 0,05$) a taxa máxima de pH (h⁻¹), descrita pelo parâmetro μ , assim como o pH inicial ($p < 0,05$). A redução do

pH inicial não era esperada, uma vez que, o pH da semente é 6,13. A redução do pH inicial das amostras, reduziu a diferença entre o pH final e o inicial. Tribst et al. (2018) observaram maiores taxas de fermentação para iogurte quando adicionado de açúcar, indicando que a sacarose melhora a taxa de crescimento das culturas de iogurte, e no caso da semente de pinhão que contém altos valores de carboidratos melhorou o parâmetro μ e o pH inicial.

O pH de 5,0 é um ponto importante durante a acidificação do iogurte, em que a formação do gel de iogurte começa devido à solubilização de fosfato de cálcio coloidal e redução da repulsão eletrostática. Portanto, o tempo gasto para atingir este pH afeta diretamente a consistência do iogurte (LEE; LUCEY, 2010). A fermentação do iogurte demorou de 4,22 a 4,46 h para atingir o pH 5,0 (Tabela 18), até 5% de semente permaneceu dentro do mesmo valor ($p > 0,05$), ao passo que a 10% aumentou o tempo para atingir o pH 5. O tempo de atingir o pH 5 foi mais lento que amostras elaboradas com leite de ovelha ou com adição de açúcar (TRIBST et al., 2018), mas comparando com iogurte produzido leite bovino foi menor (ZHANG et al., 2019).

A fase final da fermentação, de pH 5 a 4,6, é caracterizada pelo crescimento de *L. bulgaricus*. A avaliação desta fase (Tabela 10) mostrou que os iogurtes levaram 31% do tempo total até atingir o pH 4,6. A adição de 5% de semente acelerou a fermentação nessa última fase, porém a adição de semente de 5% foi mais rápida do que em 10%. Sendo metade do valor obtido por (TRIBST et al., 2018). Essa diferença indica que a matriz, a adição de açúcar e o conteúdo de lipídios, são fatores significantes para a fermentação do iogurte.

4.3.2 Caracterização da semente de pinhão e dos iogurtes

A porção de 100 g de semente, utilizados na elaboração dos iogurtes continham majoritariamente 50,17 g de umidade e 38,82 g de amido total, com 4,01 g de amido resistente. Apresentou ainda, 6,28 g de fibras alimentares totais, 2,62 g de proteínas, 1,09 g de lipídios e 0,86 g de cinzas. O pH foi de 6,23 a acidez igual a 0,24% ácido láctico. Os valores obtidos foram próximos aos relatados na literatura (GIL et al., 2021; MALTA et al., 2022). Vale ressaltar que, a semente do pinhão é fonte de fibras, pois contém mais de 6 g em 100 g alimento (BRASIL, 1998), e também devido ao amido resistente, é uma boa opção para ser adicionado na formulação de iogurte. A

incorporação do pinhão pode conferir em torno de 0,31 g/100 g para a adição de 5% de pinhão e 0,62 g/100 g para a adição de 10%.

A adição da semente aos iogurtes (Tabela 11) aumentou significativamente o conteúdo de sólidos totais e reduziu o de cinzas ($p < 0,05$). Isso já era esperado, visto que, a semente de pinhão apresenta majoritariamente amido e fibras alimentares em sua composição (GIL et al., 2021; MALTA et al., 2022). Além disso, o pinhão apresentou 4% de amido resistente em sua porção de amido total, que permanece intacto após a digestão no intestino e atinge o intestino grosso (DIMANTOV et al., 2004). A adição desse nutriente corrobora com 0,2 a 0,4 g de amido resistente em 100 g de iogurte. O amido resistente pode ser efetivo na fermentação no cólon e estimulação da atividade bacteriana, melhorando a saúde do cólon. Muitas espécies de lactobacilos e bifidobactérias são capazes de hidrolisar o amido resistente, indicando um potencial atividade prebiótica para essa fração de amido (ESCOBAR et al., 2012).

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE IOGURTES ADICIONADOS DE 0, 5 E 10% DE SEMENTE DE PINHÃO COZIDA (SP), EM BASE ÚMIDA

Parâmetros	Formulações de iogurte		
	SP ₀	SP ₅	SP ₁₀
Sólidos totais (g/100 g)	15,10 ± 0,12 ^c	16,66 ± 0,42 ^b	18,61 ± 0,21 ^a
Proteínas (g/100 g)	4,52 ± 0,04 ^a	4,57 ± 0,06 ^a	4,73 ± 0,39 ^a
Lipídios (g/100 g)	1,70 ± 0,09 ^a	1,66 ± 0,07 ^a	1,65 ± 0,12 ^a
Cinzas (g/100 g)	1,23 ± 0,06 ^a	1,01 ± 0,03 ^b	0,92 ± 0,02 ^b
K (mg/100 g)	136,70 ± 5,21 ^b	179,00 ± 5,62 ^a	190,54 ± 5,43 ^a
P (mg/100 g)	100,58 ± 4,42 ^b	154,36 ± 4,98 ^a	145,80 ± 6,97 ^a
Ca (mg/100 g)	99,96 ± 8,89 ^b	174,40 ± 4,63 ^a	161,77 ± 25,22 ^a
Mg (mg/100 g)	13,78 ± 0,81 ^b	18,54 ± 0,27 ^a	18,33 ± 1,62 ^a
Fe (mg/100 g)	0,10 < 0,01 ^a	0,10 < 0,01 ^a	0,12 < 0,01 ^a
Zn (mg/100 g)	1,10 ± 0,10 ^b	1,37 ± 0,09 ^{ab}	1,61 ± 0,14 ^a
Cu (mg/100 g)	0,19 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,05 ^a
Mn (mg/100 g)	0,46 ± 0,02 ^b	0,67 ± 0,02 ^a	0,61 ± 0,04 ^a

FONTE: A autora (2022).

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas em linha: diferença entre as formulações. Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os conteúdos de proteínas e lipídios não foram influenciados pela adição de semente. Possivelmente devido a semente apresentar menores quantidades desses nutrientes, e quando adicionado em pequena porção (5 a 10%) não ocasiona efeito significativo. Devido aos baixos valores de lipídios, os iogurtes podem ser classificados como parcialmente desnatados (0,6 - 2,9 g/100 g). Em relação ao

conteúdo de proteínas, as formulações apresentaram o dobro do mínimo estabelecido pela legislação (2,9 g/100 g), conforme a IN 46 (BRASIL, 2007). As maiores quantidades de proteínas estão associadas a adição de leite em pó desnatado (zero adição de lipídios) aos iogurtes.

A semente possui elevadas quantidades de alguns minerais como Cu (44,2%), P (31,4%), K (24,0%) e Zn (23,8%), e menores de Mg (12,8%), Mn (11,0%), Fe (11,7%) e Ca (6,2%) (MALTA et al., 2022) e a adição de pinhão aos iogurtes promoveu aumento significativamente 1,5 vezes ($p < 0,05$) o conteúdo de minerais nos iogurtes, exceto Cu e Fe ($p > 0,05$), contribuindo com a ingestão diária recomendada de minerais. Não houve diferença significativa para minerais com a adição de 5 ou 10%. Considerando que o cálcio é o mineral com menor concentração no pinhão, a combinação do iogurte com pinhão pode ser uma alternativa para melhorar a disponibilidade de nutrientes como os minerais.

4.3.3 Digestibilidade das proteínas e dos compostos bioativos no iogurte

4.3.3.1 Digestibilidade de proteínas

As formulações de iogurtes tiveram digestibilidade das proteínas em média de 90,5%, sem diferença significativa entre as formulações ($p > 0,05$), bem como a digestibilidade do pinhão (91,8%) ($p > 0,05$). Dessa forma, a adição de semente de pinhão antes ou depois da fermentação do iogurte não influenciou a digestibilidade das proteínas, sem interferir na qualidade proteica absorvida. Isso mostra que há uma boa fonte de proteínas digeríveis nos iogurtes adicionados de semente e extrato. Relatos anteriores mostraram que a digestibilidade de proteínas das amostras de iogurte adicionadas de bagaço de cranberry antes da fermentação tiveram digestibilidade de 18 a 26% enquanto que quando adicionado depois a digestibilidade aumentou para 61-82% (VARNAITÉ et al., 2022). Os autores mencionam que pode estar relacionado às peculiaridades das estruturas determinadas para os iogurtes preparados de forma diferenciada, gerando período de atraso no esvaziamento do estômago, e com isso, pode levar a sensações de distensão e plenitude gástrica. Pode ainda, estar relacionada à hidrólise mais lenta das proteínas pelas proteases pancreáticas, que requerem mais tempo para degradação e são absorvidas mais distalmente no intestino. A adição de bagaço de cranberry ao iogurte antes da

fermentação melhorará potencialmente a saciedade. Em contraste, as amostras de iogurte com bagaço de cranberry adicionadas após a fermentação sofrerão digestão gradual e mais prolongada durante as fases gástrica e intestinal (VARNAITÉ et al., 2022).

4.3.3.2 Bioacessibilidade dos compostos bioativos das formulações de iogurte

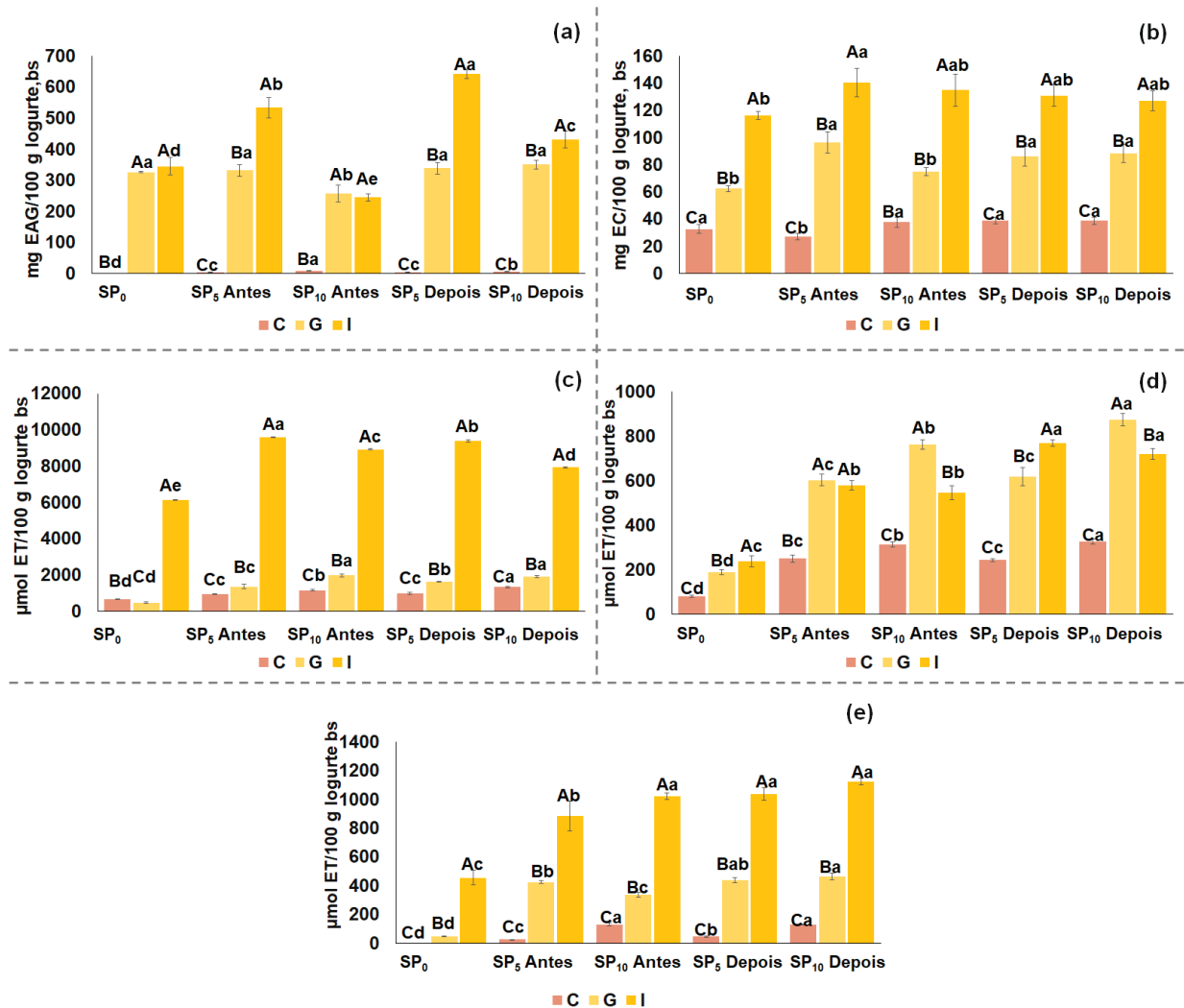
A combinação da adição de semente ao iogurte com extrato de casca de pinhão aumentou a bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante após a digestão gastrointestinal simulada comparado ao iogurte contendo apenas o extrato (Figura 21). Para a fase intestinal e para as amostras com iogurte adicionados de semente depois da fermentação, os compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante foram significativamente maiores. Com exceção do ensaio de DPPH, em que a fase gastrointestinal foi igual ou maior para as formulações SP5 e SP10 antes, e SP10 após a digestão e o ensaio ABTS que foi maior para as formulações com sementes adicionadas antes. Entretanto, o aumento de 10% de semente reduziu a bioacessibilidade dos fenólicos e a atividade antioxidante por ABTS ($p < 0,05$) comparando com a adição de 5%. O conteúdo de flavonoides e o potencial antioxidante pelos mecanismos de DPPH e FRAP ($p > 0,05$) não apresentou diferença significativa entre as porcentagens de pinhão adicionadas.

Possivelmente, o aumento da bioacessibilidade dos compostos (Figura 21) estejam relacionados a liberação dos fenólicos por ácidos ou enzimas microbianas de tecidos das sementes ou glicosídeos durante a fermentação. Além disso, a fermentação induz a quebra estrutural das paredes celulares das plantas, levando à liberação ou síntese de vários compostos antioxidantes. Esses compostos antioxidantes podem atuar como terminadores de radicais livres, quelantes de metais, inibidores de oxigênio singlete ou doadores de hidrogênio para radicais. A produção de protease, α -amilase e algumas outras enzimas podem ser influenciadas pela fermentação que pode ter atividade de quelatos íons metálicos (HUR et al., 2014).

O aumento da bioacessibilidade dos fenólicos no iogurte padrão pode ser explicado devido a atividade das enzimas pépticas e pancreáticas, quebrando as estruturas das proteínas. Essas enzimas promoveram a liberação de polifenóis ligados ao complexo proteína-polifenol e peptídeos bioativos e aminoácidos ligados às sequências de proteínas do leite (RASHIDINEJAD; BIRCH; EVERETT, 2016). Relatos

anteriores mostraram que a fortificação dos iogurtes aumentou a bioacessibilidade dos compostos bioativos (DIEP; YOO; RUSH, 2022).

FIGURA 21 - BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DOS IOGURTES ADICIONADOS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ETAPAS, COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (ECP)



FONTE: A autora (2022).

Semente de pinhão (SP) em diferentes concentrações (0, 5, e 10%) e etapas (antes ou depois da fermentação), juntamente com extrato da casca de pinhão (ECP) após a fermentação em todas formulações, exceto SP₀. Fenólicos (a), flavonoides (b) e potencial antioxidante ABTS (C), DPPH (D) E FRAP (E). Bs: base seca. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as fases da digestão para cada formulação (controle (C), gástrica (G) e intestinal (I) e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as formulações para cada fase, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Isso porque a matriz de iogurte permitiu a proteção de alguns compostos da degradação, aumentando a bioacessibilidade, possibilitando a absorção e utilização. Em iogurtes fortificados, compostos de polifenóis liberados do iogurte

foram estáveis no ambiente digestivo, portanto, seriam capazes de exercer seus efeitos biológicos no sistema gastrointestinal, o que é mais importante do que o conteúdo desses compostos no alimento não digerido correspondente (DURMUS; CAPANOGLU; KILIC-AKYILMAZ, 2021).

4.3.4 Análise de vida útil das formulações de iogurte

A adição de semente de pinhão e o extrato bioativo da casca do pinhão ao iogurte pode afetar sua estabilidade, e por consequência, sua vida útil. Para avaliar esses parâmetros, os compostos bioativos fenólicos e flavonoides totais (Tabela 12), a acidez, o pH (Tabela 13), a cor (Tabela 14), a capacidade de retenção de água, a sinérese bem como e a viscosidade (Tabela 16) foram realizadas a fim de investigar as possíveis mudanças.

4.3.4.1 Compostos bioativos

Ao avaliar a vida útil das formulações de iogurte, após 30 dias de armazenamento, notou-se que o conteúdo de fenólicos foi mantido no iogurte padrão, enquanto que os iogurtes adicionados de semente antes da fermentação foi reduzido (~17%) e os adicionados de semente depois da fermentação foi elevado de 6 a 22%.

As quantidades de flavonoides permaneceram estáveis após 30 dias de armazenamento ($p > 0,05$). A atividade antioxidante por ABTS e FRAP aumentou significativamente após 30 dias, com exceção da amostra SP10 Antes que diminuiu 59% e o SP0 que não apresentou atividade antioxidante por FRAP. Apenas as amostras SP5 Antes e SP10 Depois apresentaram redução de aproximadamente 6% para o DPPH. Os adicionados de pinhão depois da fermentação apresentaram menor variação de comportamento com uma tendencia de aumento após 30 dias de armazenamento das variáveis analisadas.

TABELA 12 – VIDA ÚTIL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.

Parâmetros	Tempo (dias)	Formulações de iogurte				
		SP ₀ [*]	SP ₅ Antes	SP ₁₀ Antes	SP ₅ Depois	SP ₁₀ Depois
Fenólicos (mg EAG/100 g, bs)	0	1,25 ± 0,08 ^{Ad}	5,17 ± 0,46 ^{Ac}	10,09 ± 0,93 ^{Aa}	4,42 ± 0,27 ^{Ac}	7,57 ± 0,31 ^{Bb}
	30	1,14 ± 0,05 ^{Ad}	4,39 ± 0,08 ^{Bc}	8,37 ± 0,30 ^{Ab}	4,69 ± 0,08 ^{Ac}	9,26 ± 0,55 ^{Aa}
Flavonoides (mg EC/100 g, bs)	0	32,77 ± 3,16 ^{Aa}	27,47 ± 2,51 ^{Ab}	37,79 ± 3,65 ^{Aa}	39,10 ± 2,18 ^{Aa}	38,92 ± 2,62 ^{Aa}
	30	33,99 ± 2,42 ^{Aab}	27,70 ± 1,27 ^{Ab}	37,25 ± 2,78 ^{Aa}	34,63 ± 3,83 ^{Aa}	33,56 ± 0,67 ^{Aab}
ABTS (µmol ET/ 100 g, bs)	0	691,10 ± 9,86 ^{Bd}	953,02 ± 10,56 ^{Bc}	1166,67 ± 33,93 ^{Bb}	1007,38 ± 64,75 ^{Bc}	1338,16 ± 26,21 ^{Ba}
	30	758,92 ± 4,39 ^{Ad}	1011,43 ± 30,12 ^{Ac}	1321,43 ± 21,25 ^{Ab}	1434,27 ± 17,15 ^{Aa}	1482,92 ± 20,86 ^{Aa}
DPPH (µmol ET/ 100 g, bs)	0	78,50 ± 5,08 ^{Ad}	249,43 ± 16,64 ^{Ac}	312,93 ± 11,73 ^{Ab}	242,30 ± 6,39 ^{Ac}	326,55 ± 10,90 ^{Aa}
	30	76,93 ± 2,11 ^{Ac}	239,80 ± 21,01 ^{Bb}	291,64 ± 30,09 ^{Aa}	235,49 ± 17,91 ^{Ab}	309,43 ± 11,71 ^{Ba}
FRAP (µmol ET/ 100 g, bs)	0	0,00 ± 0,00 ^{Ad}	26,94 ± 1,06 ^{Bc}	131,31 ± 10,03 ^{Aa}	46,39 ± 4,13 ^{Bb}	128,75 ± 3,72 ^{Ba}
	30	0,00 ± 0,00 ^{Ad}	44,77 ± 0,60 ^{Ac}	53,76 ± 4,99 ^{Bc}	125,25 ± 5,83 ^{Ab}	138,97 ± 3,57 ^{Aa}

FONTE: A autora (2022).

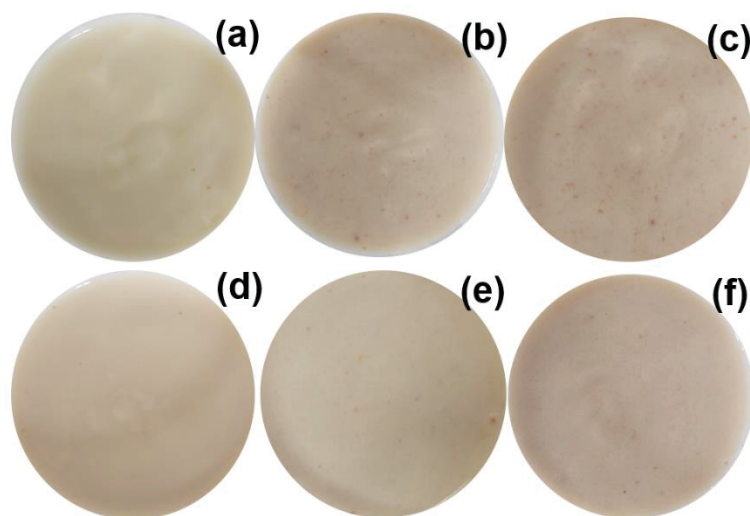
*SP₀: iogurte padrão, não recebeu ECP; bs: base seca. Média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes em coluna para cada formulação: diferença entre a vida útil. Letras minúsculas em linha para cada dia: diferença ao entre as formulações. Diferentes sobrescritos indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste Tukey (p < 0,05).

O uso combinado do extrato e a sua porção comestível aumentou a concentração dos compostos fenólicos e flavonoides com atividade antioxidante em relação ao iogurte padrão ($p < 0,05$). A estabilidade desses compostos foi significativamente maior com o aumento de 5 para 10% de semente e com a adição da semente depois da fermentação ($p < 0,05$).

4.3.4.2 Acidez, pH e cor

As formulações de iogurte (Figura 22) estão de acordo com a legislação vigente, a qual preconiza acidez de 0,6 a 1,5% (BRASIL, 2007) (Tabela 13). Tanto o pH, quanto a acidez, apresentaram variações entre as formulações e a vida útil ($p < 0,05$). Entretanto, essas variações foram menores do que 10%.

FIGURA 22 - FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADO DE SEMENTE PINHÃO (SP) E EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (ECP)



FONTE: A autora (2022).

(a) SP₀, (b) SP₅ depois, (c) SP₁₀ depois, (d) SP₀ + ECP, (e) SP₅ antes, (f) SP₁₀ antes. Iogurtes: SP₀: 0% Adição de semente; SP₅ e SP₁₀: 5 e 10 são concentrações de semente adicionadas Antes ou Depois são a etapa de adição de semente na fermentação. Todas formulações receberam extrato, exceto P₀.

Uma diferença da coloração é perceptível ao olho humano quando $\Delta E > 2$ (FRANCIS; CLYDESDALE, 1975) na avaliação da cor instrumental. Todas as formulações de iogurte adicionadas de sementes apresentaram $\Delta E > 2$, tanto quando

comparadas com o iogurte padrão (4,28 - 8,39), quanto com o acrescido de extrato (1,28 - 4,28), mostrando que o aumento da concentração de semente de pinhão no iogurte também é perceptível ao olho humano, como pode ser observado (Figura 22).

Com relação a vida útil, o iogurte padrão foi o que apresentou variação mais perceptível ao olho humano ($\Delta E > 2$), possivelmente devido à diminuição do parâmetro L^* , que pode ter ocorrido devido a sinérese. As amostras adicionadas de 5% de semente apresentaram uma variação de cor crescente ao longo do tempo, as adicionadas de 10% de semente apresentaram uma variação significativa de cor com diferença em 7 dias ($\Delta E > 2$) mas não em 30 dias ($\Delta E < 2$). Possivelmente a menor variação em 30 dias do iogurte com 10% de semente deveu-se a interação dos componentes presentes na semente e no extrato.

TABELA 13 - ACIDEZ E pH DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.

Parâmetros	Formulações	Tempo (dias)		
		0	7	30
Acidez (%)	SP ₀	0,83 ± 0,03 ^{Ba}	0,85 ± 0,04 ^{Bb}	0,96 ± 0,03 ^{Aa}
	SP ₅ Antes	0,84 ± 0,01 ^{Ba}	0,91 ± 0,01 ^{Aab}	0,89 ± 0,01 ^{Ab}
	SP ₁₀ Antes	0,84 ± 0,03 ^{Ba}	0,94 ± 0,02 ^{Aa}	0,88 ± 0,01 ^{ABb}
	SP ₅ Depois	0,85 ± 0,03 ^{Ba}	0,90 ± 0,01 ^{Bab}	0,92 ± 0,03 ^{Aab}
	SP ₁₀ Depois	0,83 ± 0,02 ^{Ba}	0,85 < 0,01 ^{Bb}	0,89 ± 0,01 ^{Ab}
pH	SP ₀	4,69 ± 0,02 ^{Aa}	4,52 ± 0,02 ^{Ba}	4,53 ± 0,01 ^{Bc}
	SP ₅ Antes	4,68 ± 0,02 ^{Aa}	4,52 ± 0,02 ^{Ba}	4,55 ± 0,01 ^{Bbc}
	SP ₁₀ Antes	4,59 ± 0,02 ^{Ab}	4,46 ± 0,07 ^{Ba}	4,51 ± 0,01 ^{ABcd}
	SP ₅ Depois	4,65 ± 0,03 ^{Aab}	4,50 ± 0,03 ^{Ba}	4,56 ± 0,02 ^{Bbc}
	SP ₁₀ Depois	4,66 ± 0,03 ^{Aab}	4,51 ± 0,01 ^{Ca}	4,59 < 0,01 ^{Ba}

FONTE: A autora (2022).

*SP0: iogurte padrão, não recebeu ECP; bs: base seca. Média ± desvio padrão. Letras minúsculas em coluna: diferença entre as formulações. Letras maiúsculas em linha: diferença ao longo do tempo na mesma formulação. Diferentes sobrescritos indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 14 – ANÁLISES DE COR DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.

logurtes		SP ₀	SP ₅ Antes	SP ₁₀ Antes	SP ₅ Depois	SP ₁₀ Depois	SP ₀ + ECP
Formulações	ΔE_{SP0^*}	-	6,14 ± 0,02	8,39 ± 0,01	5,89 ± 0,01	7,67 ± 0,02	4,28 ± 0,03
	$\Delta E_{SP0 + ECP}$	4,28 ± 0,03	2,10 ± 0,02	4,45 ± 0,01	1,68 ± 0,01	3,72 ± 0,02	-
Tempo (dias)	$\Delta E: (0 \text{ e } 7)$	1,64 ± 0,04	2,37 ± 0,06	3,27 < 0,01	1,44 ± 0,04	2,50 ± 0,01	2,42 ± 0,06
	$\Delta E: (0 \text{ e } 30)$	2,08 ± 0,03	0,14 ± 0,01	2,52 ± 0,02	2,37 ± 0,01	1,02 ± 0,06	2,23 ± 0,01
C*	0	9,98 ± 0,04 ^{Ad}	10,06 ± 0,02 ^{Bc}	10,96 ± 0,03 ^{Aa}	9,62 ± 0,00 ^{Ce}	10,16 ± 0,02 ^{Ab}	9,63 ± 0,02 ^{Ae}
	7	9,74 ± 0,02 ^{Bb}	9,46 ± 0,02 ^{Cd}	10,78 ± 0,04 ^{Ba}	9,53 ± 0,04 ^{Bcd}	9,66 ± 0,02 ^{Bc}	9,27 ± 0,03 ^{Be}
	30	9,78 ± 0,04 ^{Bd}	10,16 ± 0,02 ^{Ab}	10,72 ± 0,03 ^{Ba}	9,89 ± 0,02 ^{Ac}	9,68 ± 0,03 ^{Be}	9,69 ± 0,01 ^{Ade}
H°	0	1,40 < 0,01 ^{Ab}	1,36 < 0,01 ^{Ae}	-1,45 < 0,01 ^{Af}	1,39 < 0,01 ^{Bc}	1,37 < 0,01 ^{Ad}	1,45 < 0,01 ^{Ba}
	7	1,40 < 0,01 ^{Ab}	1,37 < 0,01 ^{Ac}	-1,42 < 0,01 ^{Cd}	1,40 45 < 0,01 ^{Ab}	1,38 < 0,01 ^{Ac}	1,46 < 0,01 ^{Aa}
	30	1,39 < 0,01 ^{Bb}	1,37 < 0,01 ^{Bc}	-1,43 < 0,01 ^{Be}	1,39 < 0,01 ^{Bb}	1,36 < 0,01 ^{Bd}	1,45 < 0,01 ^{Ba}

FONTE: A autora (2022).

*SP₀: logurte padrão, não recebeu ECP. Média ± desvio padrão. Letras minúsculas em linha: diferença entre as formulações. Letras maiúsculas em coluna: diferença ao longo do tempo na mesma formulação. Diferentes sobrescritos indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste Tukey (p < 0,05).

O valor do croma (C^*) (Tabela 14) indica a saturação da cor, valores crescentes referem-se a uma cor saturada aumentada. A saturação do iogurte padrão foi apenas 7% maior que todas as outras amostras, sendo assim, as formulações podem ser consideradas relativamente estáveis. A intensidade de H° (Tabela 14) variou entre - 1,45 a +1,46, sendo a menor para o padrão e a maior para o padrão acrescido de extrato. A adição de 5 e 10% de semente foram estáveis não apresentando diferenças entre os períodos analisados. As diferenças significativas encontradas no decorrer de 30 dias foram inferiores a 2%.

A capacidade de retenção de água (Tabela 15) dos iogurtes não foi alterada pelo tempo ($p < 0,05$), exceto na formulação de 10% adicionada de semente antes da fermentação. Entretanto, a adição de semente reduziu significativamente a capacidade de retenção de água das formulações e os iogurtes fermentados com semente apresentaram os valores mais baixos. Esse fato pode ter ocorrido em detrimento das fibras alimentares e açúcares presentes na semente que interagem com a água e a proteína do leite, formando pontes de hidrogênio (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). No entanto, como as variações foram inferiores a 10%, pode não ter havido mudanças perceptíveis em suas características.

Em relação ao período de armazenamento das formulações, somente o iogurte com semente adicionada antes da fermentação obteve redução significativa na capacidade de retenção de água ($p < 0,05$), com variação de 9%. Esse efeito pode ter ocorrido devido à ruptura parcial da rede de proteína causada pela atividade da protease enfraquecendo a estrutura do gel (CHANDAN, 2014) ou devido à acomodação da rede de proteínas durante o armazenamento (aumento nas interações eletrostáticas), expulsando o soro inicialmente retido entre as cadeias de proteínas (SODINI et al., 2004).

A sinérese espontânea das amostras de iogurte após 30 dias de armazenamento (Tabela 15) mostrou que o iogurte padrão apresentou o maior valor ($p < 0,05$), enquanto a adição de semente apresentou sinérese relativamente baixa. A sinérese ocorre devido à incapacidade do gel de iogurte em reter a fase sérica devido ao enfraquecimento da caseína e leva à liberação do soro de leite (LUCEY, 2004). Estudos anteriores verificaram que o aumento do conteúdo de sólidos totais influenciou positivamente a densidade e reduziu a sinérese de leite fermentado (VIANNA et al., 2017).

Isso corrobora com os resultados de capacidade de retenção de água, visto que a adição da semente reduziu a quase zero a sinérese. Além disso, a partir dos resultados, observou que a sinérese espontânea foi mais discriminativa do que a capacidade de retenção de água, possivelmente porque a alta força g a que as amostras foram submetidas foi suficiente para induzir uma quebra semelhante da rede de proteínas dos diferentes iogurtes (AMATAYAKUL et al., 2006).

TABELA 15 – CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA), SINÉRESE E VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES DE IOGURTE ADICIONADAS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO.

Parâmetros	Formulações	Tempo (dias)	
		0	30
CRA (%)	SP ₀	88,43 ± 2,64 ^{Aa}	87,68 ± 0,37 ^{Aa}
	SP ₅ Antes	78,53 ± 1,84 ^{Ab}	73,97 ± 0,87 ^{Ac}
	SP ₁₀ Antes	82,91 ± 3,33 ^{Aab}	75,46 ± 1,29 ^{Bc}
	SP ₅ Depois	83,69 ± 2,25 ^{Aab}	80,37 ± 2,0 ^{Ab}
	SP ₁₀ Depois	83,64 ± 2,02 ^{Aab}	80,73 ± 2,0 ^{Aab}
Sinérese (%)	SP ₀	-	0,53 ± 0,01 ^a
	SP ₅ Antes	-	0,10 < 0,01 ^d
	SP ₁₀ Antes	-	0,10 < 0,02 ^d
	SP ₅ Depois	-	0,39 ± 0,01 ^b
	SP ₁₀ Depois	-	0,41 ± 0,01 ^c
Viscosidade (Pa.s)	SP ₀	4,46 ± 0,25 ^{Bc}	5,56 ± 0,5 ^{Aa}
	SP ₅ Antes	5,37 ± 0,40 ^{Aab}	5,34 ± 0,36 ^{Aa}
	SP ₁₀ Antes	5,82 ± 0,16 ^{Aa}	5,89 ± 0,19 ^{Aa}
	SP ₅ Depois	4,84 ± 0,03 ^{Bbc}	5,89 ± 0,09 ^{Aa}
	SP ₁₀ Depois	4,98 ± 0,31 ^{Abc}	5,60 ± 0,36 ^{Aa}

FONTE: A autora (2022).

*SP₀: iogurte padrão, não recebeu ECP. Média ± desvio padrão. Letras minúsculas em coluna: diferença entre as formulações. Letras maiúsculas em linha: diferença ao longo do tempo na mesma formulação. Diferentes sobrescritos indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste Tukey (p < 0,05).

A viscosidade das formulações (Tabela 15) de iogurte variou de 4,86 a 5,82 Pa.s no primeiro dia e 5,39 a 5,89 Pa.s em 30 dias de armazenamento. Houve uma variação significativa nos iogurtes frescos (p < 0,05) em relação ao padrão no primeiro dia. A formulação padrão teve o menor valor observado, seguido das formulações adicionadas da semente depois da fermentação, e por fim as amostras com semente

fermentada com o iogurte. Ainda, houve um aumento proporcional conforme a adição de semente nas amostras fermentadas. Enquanto as amostras adicionadas de semente depois da fermentação foram iguais ($p < 0,05$).

O aumento da viscosidade das amostras adicionadas de semente pode ser devido ao alto conteúdo de fibras alimentares. Quando ocorreu a fermentação do iogurte com as sementes, possivelmente houve a quebra e transformação do amido em sacarose que em conjunto com outros açúcares presentes na semente, aumentaram as ligações de hidrogênio, aumentaram as interações e consequentemente, a viscosidade. Como as quebras não ocorreram nos iogurtes adicionados de semente depois, houve menos interações, e por consequência, menor viscosidade que aquelas com pinhão participando da fermentação. Comportamento semelhante foi observado por Varnaité et al. (2022), ao adicionar bagaço de cranberry, rico em fibras como ingrediente alimentar com atividade funcional para produção de iogurte antes ou após a fermentação.

No geral, as interações proteicas na matriz primária (somente leite) foram mais importantes do que aquelas formadas pela adição de semente antes e depois da fermentação, com e sem o extrato.

Após 30 dias de armazenamento sob refrigeração, um aumento significativo da formulação padrão e com 5% de semente adicionado depois da fermentação ($p < 0,05$) foi verificado. As formulações não apresentaram diferença significativa em 30 dias ($p > 0,05$), mostrando que houve melhor estabilidade ao longo do tempo.

4.3.5 Influência da adição do pinhão na composição química dos iogurtes

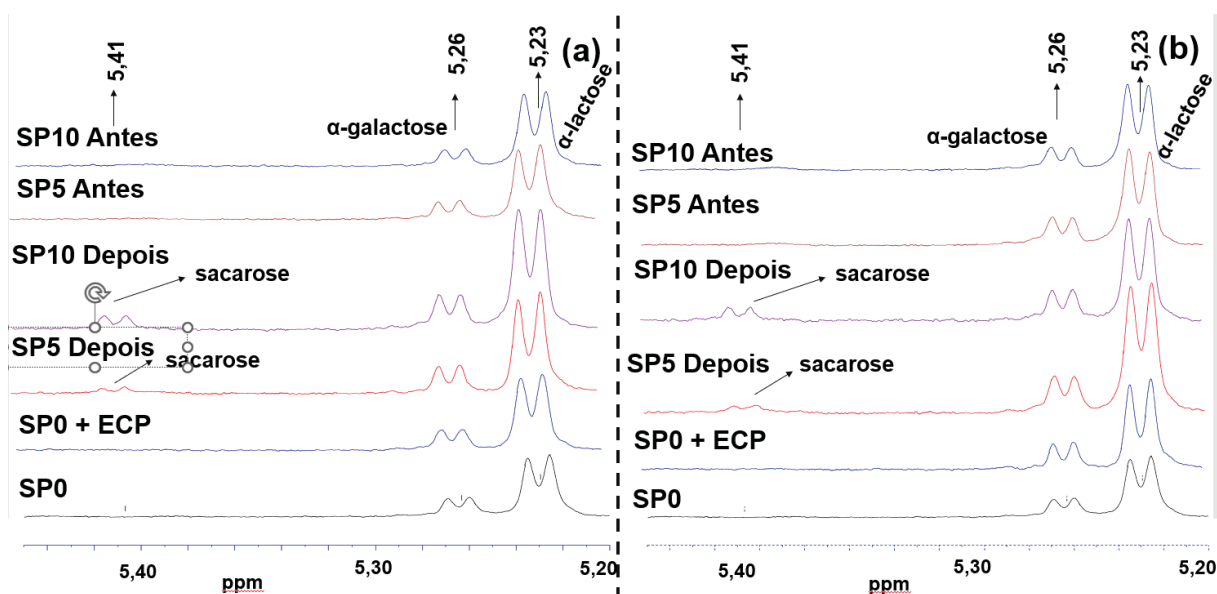
A análise qualitativa dos espectros de ^1H RMN nos tempos 0 e após 30 dias de armazenamento refrigerado mostra uma composição química relativamente estável das formulações de iogurte, exceto pela presença de sacarose no iogurte com adição de semente após a fermentação (Figura S3). Todas as formulações de iogurte foram identificadas com açúcares provenientes da fermentação do leite, como α -lactose, β -lactose, α -galactose, β -galactose, ácido cítrico, ácido láctico, lecitina (QUADRO S1), também observado anteriormente (LU et al., 2016).

No geral, qualitativamente, o armazenamento refrigerado de iogurte por 30 dias não modificou a intensidade dos espectros de ácido láctico e, apesar da descrição

da diferença estatística no parâmetro de acidez na vida útil dos iogurtes, essas diferenças foram baixas, em torno de 5-10% e modificaria fracamente os espectros.

Espectros RMN ampliados (Figura 23) detalham as bandas de sacarose nas amostras de iogurte adicionado com pinhão após a fermentação aumentou durante o armazenamento. Ocorreu um aumento de sinal de sacarose ao aumentar a concentração de sementes de 5 para 10%. A ausência de sinal de sacarose em iogurtes fermentados com a semente é justificada pelo fato dessa sacarose poder ser hidrolisada durante a fermentação, sendo consumida durante o processo. Compostos do extrato não foram detectados nos espectros RMN, o que pode estar relacionado à sua baixa concentração (25 mg/100g de iogurte). Nesse sentido, verifica-se que a adição de extrato e da semente antes ou depois da fermentação não modificou a composição química do iogurte.

FIGURA 23 - ANÁLISE QUÍMICA DE RMN EM ^1H DOS SOROS DE IOGURTE ADICIONADOS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP)



FONTE: A autora (2022).

Semente de pinhão (SP) em diferentes concentrações (0, 5 e 10%) e etapas (antes e depois) da fermentação, combinado com extrato de casca de pinhão (ECP) após a fermentação nos tempos 0 (a) e 30 dias (b) de estocagem.

4.3.6 Considerações finais

A adição de 5% e 10 % de semente de pinhão na fermentação para produção dos iogurtes não impactou no processo de fermentação. Embora tenha ocorrido diferenças estatísticas, essas variações podem ser oriundas do processo. Os dados

foram bem ajustados ao modelo padrão ($R^2 > 0,99$), sendo uma boa forma de previsão para utilização na elaboração do iogurte. A adição de semente ao iogurte contribuiu para o aumento de sólidos totais e minerais, bem como a inclusão fibras alimentares, amido resistente e minerais. As proteínas e lipídios não foram influenciadas pela adição semente. A digestibilidade da proteína foi a mesma com a adição da semente, mostrando que a combinação desse suplemento alimentar promoveu um iogurte com boa qualidade proteica. A adição da semente cozida, juntamente com o extrato bioativo da casca do pinhão, contribuiu para o aumento de compostos fenólicos e flavonoides nas amostras controle e digeridas. De maneira geral, a adição semente antes da fermentação promoveu melhores resultados de bioacessibilidade dos compostos fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante, apresentou valores estáveis de viscosidade, acidez, pH, capacidade de retenção de água e sinérese entre as formulações.

O processo de adição de semente de pinhão ao leite antes da fermentação permitiu a hidrólise de alguns compostos presentes semente, como a sacarose. Foi possível obter iogurtes com maior valor nutricional, principalmente devido as quantidades de fibras alimentares e minerais. Além disso, a contribuição de sua adição reduziu a sinérese, sendo um grande contribuinte para a estabilidade dos iogurtes.

5 CONCLUSÃO

As sementes de pinhão contêm elevados conteúdos de carboidratos e parte deles é amido, com quantidade significativa de amido resistente. Além disso, as sementes são fonte de fibras alimentares e minerais, que contribuem para a ingestão diária recomendada, de 20 a 30% para fibra e mais de 20% para os minerais Cu, P, K e Zn. As variações ambientais (temperatura, precipitação e altitude) e as localidades se correlacionaram com os conteúdos de minerais, proteína, umidade e amido total das sementes de pinhão. Amido resistente, fibra alimentar, lipídios, cinzas e cor não diferiram estatisticamente em relação as variáveis ambientais e geográficas. Os municípios mais próximos entre si, apresentaram composição nutricional das sementes de pinhão semelhante.

A extração de compostos fenólicos da casca de pinhão foi maximizada utilizando os métodos de Infusão e agitação por Shaker. Entretanto, a extração convencional por Soxhlet foi mais eficiente na extração com elevados conteúdos de fenólicos totais, flavonoides totais, taninos, fitoesteróis e maior potencial antioxidante, seguido da extração por Shaker e por Infusão, respectivamente. A inclusão do extrato bioativo da casca do pinhão pelo método de extração por Shaker em iogurte evidenciou o potencial desse extrato para o aumento dos compostos fenólicos, flavonoides totais e seu potencial antioxidante. Ainda, mostrou que a biodisponibilidade desses compostos aumenta após digestão *in vitro*. Este trabalho mostra que é possível obter extratos com alto conteúdo de fenólicos totais a partir de tamanhos de partícula da casca do pinhão maiores do que as usadas nos estudos anteriores, aliados a uma proporção de sólidos em relação ao solvente, tempo e temperatura adequados para cada método. Sendo uma oportunidade de aproveitamento desses tamanhos de partícula e redução de desperdícios. A influência do tamanho de partícula da casca do pinhão foi investigada pela primeira vez, ainda a utilização de métodos de baixo custo permitem a possibilidade de produtores de pinhão investirem em obter novos produtos não só alimentícios, como também cosméticos e fármacos.

O uso combinado de extrato bioativo da casca do pinhão e de sua semente cozida ao iogurte mostrou efeito positivo no valor nutricional das formulações, sem impacto no processo fermentativo quando a adição da semente do pinhão ao leite foi

antes da fermentação. Assim, contribuiu com a inclusão de fibras alimentares, amido resistente, aumento de minerais, fenólicos totais e potencial antioxidante do produto.

A adição da semente de pinhão antes ou depois da fermentação, nas diferentes concentrações estudadas (0%, 5% e 10%) mostraram sem alterações para a digestibilidade das proteínas. A digestão *in vitro* aumentou a digestibilidade dos fenólicos e flavonoides totais do extrato do pinhão inserido em iogurte e, conseqüentemente, aumentou o potencial antioxidante, sendo evidenciado maior bioacessibilidade na fase intestinal.

A estabilidade dos compostos fenólicos e flavonoides totais após 30 dias de armazenamento das formulações de iogurte sob refrigeração, aumentou significativamente com o aumento de 5 para 10% de semente de pinhão cozida e com a adição da semente depois da fermentação. Variações na capacidade de retenção de água, do pH e acidez do iogurte foram menores que 10% em relação ao período de armazenamento das formulações. A adição de semente diminuiu a sinérese e aumentou a viscosidade do iogurte.

A adição da semente do pinhão ao iogurte permitiu a inclusão de fibras alimentares e amido resistente, que não estão presentes naturalmente no iogurte. Isso impactou positivamente para o aumento do valor nutricional das formulações. Além disso, a etapa de adição do pinhão ao iogurte depois da fermentação ter obtido maior bioacessibilidade dos compostos bioativos após digestão gastrointestinal *in vitro*, contribui ainda mais para a disseminação desta formulação. O que torna mais prático e até usual para os consumidores, uma vez que é possível realizar o processo em suas residências. Sendo estáveis no período de sua vida útil.

Esta tese mostra que a composição nutricional do pinhão pode variar dependendo do local de coleta e que se torna mais expressivo no conteúdo de minerais. Mostra que é possível obter extratos bioativos com altas quantidades de fenólicos totais, flavonoides, taninos condensáveis e presença de fitoesteróis a partir da casca do pinhão seca, com o elevado potencial antioxidante a partir de métodos simples e de aplicação em pequenas indústrias. Esses extratos podem ser aplicados em diversos setores como alimentícios, fármacos, cosméticos. A aplicação do extrato e a semente em produtos lácteos, até então não avaliada em outros estudos traz um leque de oportunidades para o setor de inovação de produtos, agregando fibras alimentares e amido resistente e contribuindo para a saúde humana.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Received: 14 March 2022 | Revised: 5 July 2022 | Accepted: 29 July 2022
DOI: 10.1111/1750-3841.16299

HEALTH, NUTRITION, AND FOOD

Food Science WILEY

Linking geographical origin with nutritional, mineral, and visual proprieties of *pinhão* (*Araucaria angustifolia* seed) from the south of Brazil

Danielle Specht Malta¹ | Gabriel Goetten de Lima^{2,3} |
Matheus Samponi Tucunduva Arantes¹ | André Eduardo Biscaia de Lacerda⁴ |
Alvaro Luiz Mathias¹ | Washington Luiz Esteves Magalhães⁴ |
Cristiane Vieira Helm⁴ | Maria Lucia Masson¹

¹Graduate Program in Food Engineering, Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná State, Brazil

²Graduate Program in Engineering and Materials Science—PIPE, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná State, Brazil

³Materials Research Institute, Athlone Institute of Technology, Athlone, Ireland

⁴Embrapa Florestas, Colombo, Paraná State, Brazil

Correspondence

Danielle Specht Malta, Graduate Program in Food Engineering, Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, Avenue Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 100, Zip Code 81.531-980, Curitiba, Paraná State, Brazil.
Email: daniellesmalta@gmail.com

Funding information

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance code - 001 and Embrapa Florestas.

Abstract: The effect of harvest location on cooked *pinhão* seeds (*Araucaria angustifolia*) was investigated with regard to its centesimal composition, minerals, and color, and later correlated with environmental and soil variables. Significant differences between cooked *pinhão* from various harvesting locations were seen; also, principal component analysis was performed for the minerals, protein, moisture, total starch, and color parameters. The geographic location was one of the most important factors. Caçador presented greater differences: lower values for moisture, minerals, geographic parameter, and color characteristics. However, nearby localities, such as Cruz Machado with Bituruna and Lapa with São João do Triunfo, presented similar overall values for minerals and geographic parameters. Each regional geographic location was able to present unique characteristics so that the principal component analysis categorized it in specific quadrants, which is also in agreement with the CIELAB color space. However, hierarchical tree exhibited that CAÇ was the most distinct, due to the most distant municipality, presenting a unique microbiome. The *pinhão* is a source of various nutrients, which contributes to healthy dietetic daily values. It provides from 20% to 30% of dietary fiber, Cu (42.2%), P (31.1%), K (23.5%), and Zn (22.1%), while also providing quantities of Mg (12.9%), Mn (12.4%), Fe (11.5%), and Ca (6.4%). Therefore, it is possible to obtain food products based on cooked *pinhão* that contain many nutritional components associated with human health benefits.

KEYWORDS

agrobiodiversity, dietary fiber, endemic species, food composition, mineral nutrients

Practical Application: The *pinheiro-do-paraná* is a conifer that is currently endangered. However, the commercial use of its seeds may be key to guaranteeing its preservation, in addition to strengthening the economies of households

NPPC - VUP
Research &
Services & Advice
Research news
Useful contacts

→ Scientific Publications
→ Conferences and Seminars

Cooperation

Projects

Outputs

Services

Scientific journal



Journal of Food and Nutrition Research Online First Articles

Malta, D. S. – de Lima, G. G. – Leal, F. C. – Maroldi, W. V. – Mathias, L. A. – Magalhães, W. L. E. – Helm, C. V. – Masson, M. L.

Enhancing the health benefits of yogurt with pinhão seed coat extract: optimization of extraction methods and in vitro bioaccessibility

Danielle Specht Malta, Graduate Program in Food Engineering, Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, Av. Cel. Francisco H. dos Santos 100, 81530-000 Curitiba, Brazil. E-mail: daniellesmalta@gmail.com

Original article

Received 27 March 2023; 1st revised 9 May 2023; accepted 17 May 2023.



Summary: This study screened two extraction methodologies for pinhão seed coat (PSC) (*Araucaria angustifolia*), Infusion and Shaker and compared with Soxhlet, so as to evaluate the potential use of the resulting bioactive extract in dairy products. Also, to provide an accessible product to small and medium agribusinesses. The Shaker method presented the highest extraction efficiency compared to infusion but lower than Soxhlet; however, obtained 50 % lethality values for *Artemia salina* in safer dosages compared to the other two extraction methods. Therefore, was chosen to be incorporated in yogurt, which resulted in a significant enhancement of phenolics (100 %), flavonoids (19 %), antioxidant potential by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay (17 %), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (116 %) assay, compared to control. Additionally, samples showed good stability during 30 days of shelf-life tests. Toxicity tests using *Artemia salina* also showed low toxicity. In vitro gastrointestinal digestion increased the bioaccessibility of bioactive compounds such as phenolics, flavonoids, and potential antioxidants. This bioactive extract has potential to be used as a functional ingredient in dairy products without affecting their taste, a significant contribution since the seed coat is considered a residue and can incorporate aggregated value to food products.

Keywords: bioactive compounds; antioxidant; phenolics; sterols



REFERÊNCIAS

- AACC. **Approved Methods of Analysis Method 32-05.01. Total Dietary Fiber**. 11. ed. MN, U.S.A: Saint Paul, 2009.
- ABD-RAZAK, N. H.; CHEW, Y. M. J.; BIRD, M. R. Membrane fouling during the fractionation of phytosterols isolated from orange juice. **Food and Bioprocess Processing**, v. 113, p. 10–21, 2019.
- ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, Gas and Liquid Chromatography of Non-Saponifiable Lipids. Part I. v. 935, n. 1, p. 173–201, 2001.
- ABUMWEIS, S. S. et al. Implementing Phytosterols Into Medical Practice as a Cholesterol-Lowering Strategy: Overview of Efficacy, Effectiveness, and Safety. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 30, n. 10, p. 1225–1232, 2014.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H. Microwave-assisted extraction of phenolics from Hibiscus sabdariffa calyces: Kinetic modelling and process intensification. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 528–535, 2019.
- ALONSO-CARRILLO, N. et al. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 213–221, 2017.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- AMARANTE, C. V. T. DO et al. 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, 2007.
- AMAROWICZ, R.; KARAMAC, M.; SHAHIDI, F. Synergistic Activity of Capelin Protein Hydrolysates with Synthetic Antioxidants in a Model System. **Journal of Food Lipids**, v. 6, n. 4, p. 271–275, 1999.
- AMATAYAKUL, T. et al. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 40–51, 2006.
- AMBAVADE, S. D.; MISAR, A. V.; AMBAVADE, P. D. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: a review. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 193–211, 2014.
- ANDRADE, C.; CORTE-REAL, J. Assessment of the spatial distribution of continental-oceanic climate indices in the Iberian Peninsula: ASSESSMENT OF THE SPATIAL DISTRIBUTION OF CLIMATE INDICES IN IBERIA. **International Journal of Climatology**, v. 37, n. 1, p. 36–45, jan. 2017.

ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária SIA Trecho 5, 2019. v. 1

AO, Z. et al. Starch with a Slow Digestion Property Produced by Altering Its Chain Length, Branch Density, and Crystalline Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4540–4547, 2007.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International Method 985.29**. 18. ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2005.

AOAC. **Official methods of analysis: of AOAC international**. 20. ed. Rockville, MD: AOAC International, 2016.

ARAUJO, M. C. et al. Macronutrient consumption and inadequate micronutrient intake in adults. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 177–189, 2013.

ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 2017.

ASIOLI, D. et al. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, p. 58–71, 2017.

ASLAM, M. et al. Phytochemical and Ethno-Pharmacological Review of the Genus *Araucaria* – Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 651–659, 28 ago. 2013.

ASTARITA, L. V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W. Free Amino Acid, Protein and Water Content Changes Associated with Seed Development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 1, p. 53–59, 2003.

ATHUKORALA, Y. et al. Potential Antioxidant Activity of Marine Red Alga *Gracilaria* Filicina Extracts. **Journal of Food Lipids**, v. 10, n. 3, p. 251–265, 2003.

ATTA, E. M.; MOHAMED, N. H.; ABDELGAHAWAD, A. A. M. ANTIOXIDANTS: AN OVERVIEW ON THE NATURAL AND SYNTHETIC TYPES. **European Chemical Bulletin**, v. 6, n. 8, p. 365–375, 5 set. 2017.

BAI, Y. et al. Resistant starch intake alleviates collagen-induced arthritis in mice by modulating gut microbiota and promoting concomitant propionate production. **Journal of Autoimmunity**, v. 116, p. 102564, 2021.

BALTAS, E. Spatial distribution of climatic indices in northern Greece. **Meteorological Applications**, v. 14, n. 1, p. 69–78, 2007.

BARBI, R. C. et al. Ripe and unripe inajá (*Maximilia maripa*) fruit: A new high source of added value bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127333, 2020.

BARBI, R. C. T. et al. Eriobotrya japonica seed as a new source of starch: Assessment of phenolic compounds, antioxidant activity, thermal, rheological and morphological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 646–658, 2018.

BARBI, R. C. T. et al. Subcritical propane extraction of high-quality inajá (*Maximiliana maripa*) pulp oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 153, p. 104576, 2019.

BARBOSA, J. Z. et al. Soil fertility affects elemental distribution in needles of the conifer *Araucaria angustifolia*: a microanalytical study. **CERNE**, v. 23, n. 2, p. 257–266, 2017.

BARBOSA, J. Z. et al. Elemental composition and nutritional value of *Araucaria angustifolia* seeds from subtropical Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 1073–1077, 2019.

BELLATTO, G. A.; BRAGUINI, W. L. Assessment of the use of cooked *Araucaria angustifolia* seed coats extract as food for brine shrimp. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 9, p. 813–819, 2020.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 53–68, 2019.

BIN SAYEED, M. S. et al. Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol. **Medicines**, v. 3, n. 4, 2016.

BRANCO, C. DOS S. et al. Mitochondria and redox homoeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 108–118, 2015.

BRANCO, C. S. et al. Chemical Constituents and Biological Activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: A Review. **Journal of Organic & Inorganic Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2016.

BRAND-MILLER, J.; BUYKEN, A. E. The glycemic index issue: **Current Opinion in Lipidology**, v. 23, n. 1, p. 62–67, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998** Brasília, DF. 1998.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITES FERMENTADOS. . 23 out. 2007.

BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, n. 4, p. 217–225, 2008.

CANTRILL, R.; KAWAMURA, Y. Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and Technical Assessment. **69th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**, p. 1–13, 2008.

CAPELLA, A. C. D. V.; PENTEADO, P. T. P. D. S.; BALDI, M. E. Semente de Araucaria Angustifolia: Aspectos Morfológicos e composição química da farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 135–142, 2009.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Changes of Antioxidant Compounds in a Fruit Juice-Stevia rebaudiana Blend Processed by Pulsed Electric Technologies and Ultrasound. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 7, p. 1159–1168, 2016.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa, 1994.

CARVALHO, P. E. R. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica;, 2003. v. 1

CHANDAN, R. C. Dairy - Fermented Products. Em: CLARK, S.; JUNG, S.; LAMSAL, B. (Eds.). **Food Processing**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 405–436.

CLADERA-OLIVERA, F. et al. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (Araucaria angustifolia seeds). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 5, p. 900–907, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F. **Estudos tecnológicos e de engenharia para o armazenamento e processamento do pinhão**. Doutorado (Tese)—Porto Alegre: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F. et al. Modeling water adsorption isotherms of pinhão (Araucaria angustifolia seeds) flour and thermodynamic analysis of the adsorption process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 3, p. 826–843, 2011.

CLARKSON, C. et al. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2–3, p. 177–191, 2004.

CLIMATE-DATA.ORG. **Dados climáticos para cidades mundiais - Climate-Data.org**. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/>>. Acesso em: 11 set. 2020.

COMUNIAN, T. A. et al. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017.

CORDENUNSI, B. R. et al. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3412–3416, 2004.

CORROCHANO, A. R. et al. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 54–67, 2019.

CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O. et al. Inhibition of Pro-inflammatory Responses and Antioxidant Capacity of Mexican Blackberry (*Rubus* spp.) Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9542–9548, 2010.

DA COSTA, F. J. O. G. et al. Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 172–177, 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. 4. ed. [s.l.] Boca Raton: CRC Press, 2008.

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, 2012.

DAUDT, R. M. et al. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, 2014.

DAUDT, R. M. et al. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 573–580, 2015.

DAUDT, R. M. et al. Comparative study on properties of edible films based on pinhão (*Araucaria angustifolia*) starch and flour. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 279–287, 2016.

DAUDT, R. M. et al. Development of edible films based on Brazilian pine seed (*Araucaria angustifolia*) flour reinforced with husk powder. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 60–67, 2017.

DE BRABANDERE, A. G.; DE BAERDEMAEKER, J. G. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 3–4, p. 221–227, 1999.

DE CAMARGO, A. C. et al. Opinion on the Hurdles and Potential Health Benefits in Value-Added Use of Plant Food Processing By-Products as Sources of Phenolic Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3498, 2018.

DE CAMARGO, A. C. et al. Should we ban total phenolics and antioxidant screening methods? The link between antioxidant potential and activation of NF- κ B using phenolic compounds from grape by-products. **Food Chemistry**, v. 290, p. 229–238, 2019.

DE FREITAS, T. B. et al. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 28–34, 2018.

DE LIMA, T. A. DE M. et al. Characterization of Gels and Films Produced from Pinhão Seed Coat Nanocellulose as a Potential Use for Wound Healing Dressings and Screening of Its Compounds towards Antitumour Effects. **Polymers**, v. 14, n. 14, p. 2776, 2022.

DE SOUZA, K. C. et al. Soy Protein Isolate Films Incorporated with Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) Extract for Potential Use as Edible Oil Active Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, 2020.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DESTRO, B. G. I. **Extração de óleo essencial de anis-estrelado (*Illicium verum*) e imobilização em microcápsula para liberação guiada**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

DIEP, T. T.; YOO, M. J. Y.; RUSH, E. Effect of In Vitro Gastrointestinal Digestion on Amino Acids, Polyphenols and Antioxidant Capacity of Tamarillo Yoghurts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2526, 2022.

DIMANTOV, A. et al. Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93–100, 2004.

DURMUS, N.; CAPANOGLU, E.; KILIC-AKYILMAZ, M. Activity and bioaccessibility of antioxidants in yoghurt enriched with black mulberry as affected by fermentation and stage of fruit addition. **International Dairy Journal**, v. 117, p. 105018, 2021.

EMBRAPA. **A araucária está em extinção?** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/pinhao>>. Acesso em: 1 jun. 2020.

ESCOBAR, M. C. et al. Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 2779–2787, 2012.

ESPÍRITO-SANTO, A. P. et al. Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 224–231, 2013.

FONSECA, L. M. et al. Electrospun Starch Fibers Loaded with Pinhão (*Araucaria angustifolia*) Coat Extract Rich in Phenolic Compounds. **Food Biophysics**, 2020.

FONSECA, R. C. et al. Assessment of toxic potential of Cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 251–256, 2013.

FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. **Food Colorimetry: Theory and Applications**. Westport, Connecticut: AVI Publishing Co. Inc., 1975.

FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas e plantas: a medicina dos simples**. 6. ed. Erexim: Edelbra, 2001.

FUENTES-ZARAGOZA, E. et al. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 931–942, 2010.

GAMA, T. M. M. T. B. et al. A influência de tratamentos térmicos no teor de amido, colorimetria e microscopia de pinhão nativo (*Araucaria angustifolia*) e pinhão proveniente de polinização controlada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 2, p. 161–178, 2010.

GIL, B. V. et al. Proximate composition and kinetics drying of sweet pine nuts compared to typical nuts of *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 51, n. 4, 2021.

GRANATO, D. et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471–475, 2018.

HAIR, J. F. et al. **Multivariate Data Analysis**. 6. ed. [s.l.] Pearson Education, Inc., 2013.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HAN, N.-R.; KIM, H.-M.; JEONG, H.-J. The β -sitosterol attenuates atopic dermatitis-like skin lesions through down-regulation of TSLP: **Experimental Biology and Medicine**, 2014.

HASHEMI, S. M. B. et al. Effects of pulsed thermosonication treatment on fungal growth and bioactive compounds of *Berberis vulgaris* juice. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 7, p. 1589–1596, 2018.

HASHIM, I. B.; KHALIL, A. H.; AFIFI, H. S. Quality characteristics and consumer acceptance of yogurt fortified with date fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5403–5407, 2009.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in-vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. **LWT**, v. 89, p. 164–170, 2018.

HERRERO, M. et al. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417–423, 2005.

HOPPERT, K. et al. Consumer acceptance of regular and reduced-sugar yogurt enriched with different types of dietary fiber. **International Dairy Journal**, v. 28, n. 1, p. 1–7, 2013.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUR, S. J. et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

IBGE. **Tabela 289: Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo.**, 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado>>. Acesso em: 1 jun. 2020

IKEDA, M. et al. Influence of Brazilian pine seed flour addition on rheological, chemical and sensory properties of gluten-free rice flour cakes. **Ciência Rural**, v. 48, n. 6, p. e20170732, 2018.

IOM. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids.** Washington, D.C.: National Academies Press, 2005. p. 10490

IOM. **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements.** Washington, DC: The National Academies Press, 2006.

IZADI, Z. et al. Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5341–5346, 1 ago. 2015.

JONES, P. et al. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 217–227, 1997.

JOUBRAN, Y.; MOSCOVICI, A.; LESMES, U. Antioxidant activity of bovine alpha lactalbumin Maillard products and evaluation of their in vitro gastro-duodenal digestive proteolysis. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1229–1240, 2015.

JOUKI, M. et al. Production of synbiotic freeze-dried yoghurt powder using microencapsulation and cryopreservation of *L. plantarum* in alginate-skim milk microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 122, p. 105133, 2021.

KANGSAMAKSIN, T. et al. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- α . **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 2017.

KOEHNLEIN, E. et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, p. 512–518, 2012.

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. **FactoMineR**: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, 2008.

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. Formation and Physical Properties of Yogurt. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1127–1136, 2010.

LEITE, D. M. et al. Nutritional evaluation of *Araucaria angustifolia* seed flour as a protein complement for growing rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 7, p. 1166–1171, 2008.

LI, Y. O.; KOMAREK, A. R. Dietary fibre basics: Health, nutrition, analysis, and applications. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 47–59, 2017.

LIMA, A. DE. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. Doutorado em Bromatologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 23 abr. 2008.

LIMA, G. G. et al. Characterisation and *in vivo* evaluation of *Araucaria angustifolia* pinhão seed coat nanosuspension as a functional food source. **Food & Function**, v. 11, n. 11, p. 9820–9832, 2020.

LU, Y. et al. Complex Mixture Analysis of Organic Compounds in Yogurt by NMR Spectroscopy. **Metabolites**, 2016.

LUCEY, J. A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2–3, p. 77–84, 2004.

LUKIĆ, M. et al. Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 251–258, 2013.

MALTA, D. S. et al. Impact of the preservation methods of sheep milk on the characteristics of Requeijão cremoso processed cheese. **International Dairy Journal**, v. 121, p. 105101, 2021.

MALTA, D. S. et al. Linking geographical origin with nutritional, mineral, and visual proprieties of *pinhão* (*Araucaria angustifolia* seed) from the south of Brazil. **Journal of Food Science**, p. 1750- 3841.16299, 2022.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; DOS REIS, M. S. Reproductive phenology and seed production of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 52, p. 89–109, 2004.

MATSUOKA, K. et al. Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 154, n. 2, p. 87–93, 2008.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. 2. ed. [s.l.] Lages: Artes Gráficas Princesa LTDA, 1994. v. 5

MEGURO, S. et al. Effect of phytosterols in dietary diacylglycerol on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Nutrition**, v. 19, n. 7, p. 670–675, 2003.

MERAH, O.; MOULOUNGUI, Z. Tetraploid Wheats: Valuable Source of Phytosterols and Phytostanols. **Agronomy**, v. 9, n. 4, p. 201, 2019.

MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 6, p. 457–500, 2002.

MOTA, G. S. T. DA et al. Antioxidant Activity of Cosmetic Formulations Based on Novel Extracts from Seeds of Brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertoll) Kuntze. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, n. 3, p. 190–202, 2014.

NAGARAJAPPA, V. et al. Fortification of milk with phytosterol and its effect on sensory and physicochemical properties. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 57, n. 1, p. 63–70, 2018.

NIELSEN, S. D. et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.

OLDONI, T. L. C. et al. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306–312, 2016.

OLIVEIRA, M. M. DE et al. Effect of dynamic high pressure on milk fermentation kinetics and rheological properties of probiotic fermented milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 67–75, 2014.

OLIVEIRA, R. F. et al. Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5601–5614, 2015.

OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clacídica de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 230–239, 2016.

PALÁCIO, S. M. et al. Silver nanoparticles effect on *Artemia salina* and *Allium cepa* organisms: influence of test dilution solutions on toxicity and particles aggregation. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 5, p. 836–850, 2021.

PARANÁ. **IAT libera a colheita e venda do pinhão, mas reforça condição de maturação**. , 2021. Disponível em: <<https://www.aen.pr.gov.br/Noticia/IAT-libera-colheita-e-venda-do-pinhao-mas-reforca-condicao-de-maturacao>>

PASSARI, L. M. Z. G.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Analytica Chimica Acta**, v. 821, p. 89–96, 2014.

PERALTA, R. M. et al. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 85–93, 2016.

PESSIONE, E.; CIRINCIONE, S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

PIIRONEN, V. et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 939–966, 2000.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 223–230, 1985.

QUIDEAU, S. et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.** Methodology Reference. Disponível em: <<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>>. Acesso em: 14 set. 2020.

RAJABI, S. et al. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20, 2015.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E. J.; EVERETT, D. W. Antioxidant activity and recovery of green tea catechins in full-fat cheese following gastrointestinal simulated digestion. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 13–24, 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

REZENDE, S. C. **Valorização da casca do pinhão, um subproduto da semente de Araucaria angustifolia, para produção de materiais poliméricos.** Dissertação (Mestrado)—Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2016.

SAH, B. N. P. et al. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chemistry**, v. 156, p. 264–270, 2014.

SAKAMOTO, S.; NAKAHARA, H.; SHIBATA, O. Miscibility Behavior of Sphingomyelin with Phytosterol Derivatives by a Langmuir Monolayer Approach. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 10, p. 809–824, 2013.

SAMPAIO, D. A. et al. Approach on the integument lignin profile of seeds of Araucaria angustifolia. **Bosque (Valdivia)**, v. 37, n. 3, p. 549–555, 2016.

SAMPAIO, D. A. et al. Anatomical and Physicochemical Characterization of the Araucaria angustifolia Seed Coat. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019.

SANT'ANNA, V. et al. Effect of cooking on polyphenols and antioxidant activity of Araucaria angustifolia seed coat and evaluation of phytochemical and microbiological stability over storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 1932–1936, 2016.

SANTOS, C. H. K. et al. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, v. 261, p. 216–223, 2018.

SANTOS, G. M. et al. Annual growth rings in a sample of Paraná pine (*Araucaria angustifolia*): Toward improving the ^{14}C calibration curve for the Southern Hemisphere. **Quaternary Geochronology**, v. 25, p. 96–103, 2015.

SANTOS, K. A. et al. Extraction of *Morus alba* leaves using supercritical CO_2 and ultrasound-assisted solvent: Evaluation of β -sitosterol content. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 159, p. 104752, 2020.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SCHVEITZER, B. et al. Caracterização química de pinhões – sementes de *Araucária angustifolia* – em diferentes formas de preparo. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 3, n. 2, p. 93–104, 2014.

SHAHIDI, F.; AMAROWICZ, R. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1197–1199, 1996.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. (EDS.). Lipid Oxidation: Measurement Methods. Em: **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2005. p. 357–385.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. Em: SHAHIDI, F.; HO, C.-T. (Eds.). **Antioxidant Measurement and Applications**. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 2007. v. 956p. 36–66.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, Natural Antioxidants. v. 18, p. 757–781, 2015.

SILVA, A. D. et al. In vitro Bioaccessibility of Proteins, Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity of *Amaranthus viridis*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 478–486, 2021.

SILVA, C. M. DA et al. Extraction of oil and bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze using subcritical n-propane and organic solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 112, p. 14–21, 2016.

SILVA, E. F. R. et al. Characterization of the chemical composition (mineral, lead and centesimal) in pine nut (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) using exploratory data analysis. **Food Chemistry**, v. 369, p. 130672, 2022.

SILVA, F. C. D. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

SILVA, H. D. et al. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. mbrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE). 2001.

SILVA, S. M. et al. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SODINI, I. et al. The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 113–137, 2004.

SPADA, J. C. et al. Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1166–1173, 2012.

STAHEL, W. R. Sustainability and the Performance Economy. Em: STAHEL, W. R. (Ed.). **The Performance Economy**. London: Palgrave Macmillan UK, 2010. p. 269–287.

SUTTIARPORN, P. et al. Structures of Phytosterols and Triterpenoids with Potential Anti-Cancer Activity in Bran of Black Non-Glutinous Rice. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1672–1687, 2015.

TABART, J. et al. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1226–1233, 2009.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. The Type and Concentration of Milk Increase the in Vitro Bioaccessibility of Coffee Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11056–11064, 2012.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt science and technology**. 2. ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, 2007.

TOLVE, R. et al. Microencapsulation as a Tool for the Formulation of Functional Foods: The Phytosterols' Case Study. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 470, 2020.

TOMIC, N. et al. Enrichment of yoghurt with insoluble dietary fiber from triticale – A sensory perspective. **LWT**, v. 80, p. 59–66, 2017.

TORMENA, C. D. et al. Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. **Talanta**, v. 191, p. 382–389, 2019.

TOUATI, N. et al. Effect of Storage Time and Temperature on the Quality of Fruit Nectars: Determination of Nutritional Loss Indicators. **Journal of Food Quality**, v. 39, n. 3, p. 209–217, 2016.

TRIBST, A. A. L. et al. Fermentation profile and characteristics of yoghurt manufactured from frozen sheep milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 36–45, 2018.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 356–365, 2013.

UDDIN, M. S. et al. Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. **Separation Science and Technology**, v. 53, n. 14, p. 2206–2223, 2018.

UDDIN, MD. S. et al. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1385–1394, 2015.

VARNAITÉ, L. et al. Fiber-Rich Cranberry Pomace as Food Ingredient with Functional Activity for Yogurt Production. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 758, 2022.

VECCHIO, R.; VAN LOO, E. J.; ANNUNZIATA, A. Consumers' willingness to pay for conventional, organic and functional yogurt: evidence from experimental auctions: Consumer WTP for conventional, organic and functional yogurt. **International Journal of Consumer Studies**, v. 40, n. 3, p. 368–378, 2016.

VIANNA, F. S. et al. Development of new probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 154–162, 2017.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. DE. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1184–1192, 2008.

WHITE, P. J. Chapter 2 - Ion Uptake Mechanisms of Individual Cells and Roots: Short-distance Transport. Em: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2012. p. 7–47.

WHO. **Guideline: Potassium Intake for Adults and Children**. Geneva: World Health Organization, 2012.

WHO/FAO. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2. ed. Rome, Italy: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.

WOLF, R. B. et al. Effect of temperature on soybean seed constituents: Oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, n. 5, p. 230–232, 1982.

XU, B. et al. Characterization and authentication of four important edible oils using free phytosterol profiles established by GC-GC-TOF/MS. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6860–6870, 2014.

XU, B. et al. Determination of free steroidal compounds in vegetable oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 245, p. 415–425, 15 abr. 2018.

XU, Y. et al. Physical and nutritional properties of edamame seeds as influenced by stage of development. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 2, p. 193–200, 2016.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 11, p. 752–767, 2001.

YIN, Y. et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 9, p. 1525–1533, 2018.

YOUNG, V. R.; PELLETT, P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 1203S–1212S, 1994.

YU, D. et al. Chemical Compositions of Edamame Genotypes Grown in Different Locations in the US. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 620426, 2021.

ZHANG, G.; SOFYAN, M.; HAMAKER, B. R. Slowly Digestible State of Starch: Mechanism of Slow Digestion Property of Gelatinized Maize Starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4695–4702, 2008.

ZHANG, Q.-W.; LIN, L.-G.; YE, W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 20, 2018.

ZHANG, T. et al. Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. **LWT**, v. 101, p. 276–284, 2019.

ZHAO, L. et al. Improving antioxidant activity of lignin by hydrogenolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 228–235, 2018.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

ZORTÉA-GUIDOLIN, M. E. B. et al. Structural and functional characterization of starches from Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*). **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 19–26, 2017.

ZOU, Y. et al. Sonication enhances quality and antioxidant activity of blueberry juice. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 599–603, 2017.

MATERIAL SUPLEMENTAR

S1 MATERIAL E MÉTODOS

O tratamento dos dados das variáveis ambientais, geográficas e de solo para a discussão do item 4.1.5 foram obtidos conforme equações obtidas pela literatura. As variáveis ambientais foram calculadas da seguinte forma: O *Marsz Oceanity Index* foi de acordo com Andrade e Corte-Real (2017) enquanto as outras variáveis foram realizadas usando Baltas (2007).

S1.1 Índice de Continentalidade de Johansson

O Índice de Continentalidade de Johansson é usado para a classificação climática entre climas continentais e oceânicos (S1). Onde: E = variação anual das temperaturas médias mensais do ar, em °C, (diferença entre as temperaturas médias mensais máxima e mínima do ar) e f = latitude geográfica da estação. Valores inferiores a 33 são considerados marítimos, enquanto valores superiores são considerados continentais.

$$k = \frac{1,7E}{\text{sen } f} - 20,4 \quad (\text{S1})$$

S1.2 Índice de Oceanidade de Kerner

Kerner, motivado pelo fato de que em climas marinhos os meses de primavera são mais frios que os meses de outono. Onde To e Ta são os valores médios da temperatura do ar de outubro e abril, respectivamente, e E é a variação anual das temperaturas médias mensais do ar, em °C (S2). Valores pequenos indicam clima continental, enquanto valores acima de 10 significam clima marítimo.

$$k1 = \frac{100 (To - Ta)}{E} \quad (\text{S2})$$

S1.3 Índice de Oceanidade de Marsz (MOI)

Onde φ é a latitude, T_{amb} é a temperatura ambiente e as demais são constantes (S3). Valores inferiores a 2 são considerados continentais, enquanto oceânicos são valores superiores a 3.

$$MOI = \frac{0.731\varphi + 1.767}{T_{amb}} \quad (S3)$$

S1.4 Índice de Aridez De Martonne

Este é um índice de aridez-umidade e só é aplicável localmente. A aridez é o grau em que um clima carece de umidade efetiva e promotora da vida. Uma medida de aridez de uma região é dada pela seguinte relação (S4). Onde P é a precipitação média anual (mm) e T ($^{\circ}\text{C}$) a temperatura média anual do ar. O valor é então comparado a uma lista padrão de índice de classificação climática. Valores abaixo de 10 é considerado seco, valores maiores que isso indicam um ambiente mais úmido até acima de 35 significa muito úmido.

$$I_{Dm} = \frac{P}{T+10} \quad (S4)$$

S1.5 Índice Combinativo Pinna

O Índice Combinativo Pinna é dado pela seguinte relação (S5). Onde P e T são os valores médios anuais de precipitação e temperatura do ar e P_d , T_d são os valores médios de precipitação e temperatura do ar do mês mais seco. Este índice descreve melhor as regiões e estações do ano. A mesma consideração de índice para De Martonne pode ser atribuída com esses valores

$$I_p = \frac{1}{2} + \left(\frac{P}{T+10} + \frac{12 P_d}{T_d+10} \right) \quad (S5)$$

TABELAS REFERENTES AO ITEM 4.1

TABELA S1 - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, VALOR CALÓRICO TOTAL, MINERAIS E VARIÁVEIS AMBIENTAIS DE SEMENTES DE PINHÃO DE CINCO LOCALIDADES DA REGIÃO SUL DO BRASIL, EM BASE SECA *

Parâmetros		BIT	CAÇ	CM	LAP	SJT
Umidade (g/100 g)		49,38 ± 0,14 ^a	45,94 ± 0,37 ^c	47,04 ± 0,15 ^{bc}	46,34 ± 0,43 ^{bc}	47,36 ± 0,85 ^b
CT (g/100 g)		35,09 ± 0,01 ^e	38,99 ± 0,04 ^c	42,09 ± 0,12 ^a	39,82 ± 0,04 ^b	38,41 ± 0,22 ^d
AT (g/100 g)		39,72 ± 2,88 ^a	37,15 ± 0,51 ^{ab}	35,23 ± 1,87 ^{ab}	31,43 ± 0,26 ^b	36,10 ± 2,84 ^{ab}
AR (g/100 g)		4,70 ± 0,31 ^a	4,17 ± 0,48 ^a	4,29 ± 0,12 ^a	3,63 ± 0,46 ^a	4,83 ± 0,01 ^a
FT (g/100 g)		14,56 ± 3,05 ^a	13,05 ± 2,52 ^a	12,47 ± 3,39 ^a	16,50 ± 2,54 ^a	14,30 ± 2,52 ^a
FI (g/100 g)		9,94 ± 2,61 ^a	10,77 ± 1,57 ^a	10,53 ± 2,73 ^a	13,47 ± 1,49 ^a	11,50 ± 1,48 ^a
FS (g/100 g)		4,62 ± 0,44 ^a	2,28 ± 0,95 ^a	2,04 ± 0,66 ^a	3,04 ± 1,05 ^a	2,80 ± 1,04 ^a
Proteína (g/100 g)		6,66 ± 0,04 ^{bc}	7,22 ± 0,58 ^{abc}	6,17 ± 0,23 ^c	8,00 ± 0,33 ^a	7,81 ± 0,71 ^{ab}
Cinza (g/100 g)		3,17 ± 0,01 ^a	2,88 ± 0,04 ^a	2,85 ± 0,12 ^a	3,13 ± 0,04 ^a	2,87 ± 0,22 ^a
Lipídio (g/100 g)		0,80 ± 0,12 ^a	0,71 < 0,01 ^a	1,20 ± 0,05 ^a	1,12 ± 0,36 ^a	0,51 ± 0,02 ^a
CVT (kJ/100 g)		1392,4 ± 0,14 ^c	1420,53 ± 0,66 ^b	1440,93 ± 1,98 ^a	1367,03 ± 0,63 ^d	1395,53 ± 3,71 ^c
K (mg/100 g)		1731,86 ± 30,18 ^b	1325,69 ± 28,26 ^{cd}	1088,87 ± 47,52 ^e	1950,55 ± 84,03 ^a	1393,11 ± 116,70 ^c
P (mg/100 g)		416,50 ± 3,99 ^b	344,99 ± 14,45 ^{cd}	320,37 ± 1,97 ^e	534,23 ± 11,80 ^a	363,53 ± 1,98 ^c
Ca (mg/100 g)		79,02 ± 19,76 ^b	77,07 ± 14,13 ^b	81,82 ± 5,45 ^b	161,51 ± 10,76 ^a	186,80 ± 10,97 ^a
Mg (mg/100 g)		63,81 ± 7,69 ^b	36,16 ± 2,72 ^d	44,94 ± 5,56 ^{cd}	80,79 ± 8,23 ^a	54,90 ± 5,59 ^{bc}
Fe (mg/100 g)		3,56 < 0,01 ^a	2,28 ± 0,39 ^c	3,27 ± 0,11 ^{ab}	2,67 ± 0,28 ^b	2,79 ± 0,11 ^{bc}
Zn (mg/100 g)		2,45 ± 0,07 ^{ab}	2,31 ± 0,15 ^{ab}	2,23 ± 0,11 ^b	2,67 ± 0,06 ^a	2,41 ± 0,27 ^{ab}
Cu (mg/100 g)		0,76 ± 0,05 ^a	0,72 ± 0,04 ^a	0,76 < 0,01 ^a	0,68 ± 0,09 ^a	0,52 ± 0,04 ^b
Mn (mg/100 g)		0,78 ± 0,06 ^a	0,14 ± 0,02 ^c	0,40 ± 0,06 ^b	0,34 < 0,01 ^b	0,67 ± 0,06 ^a
Altitude (m)		881	914	815	917	786
Precipitação (mm)	Total anual	1751	1707	1694	1320	1451
	Média mensal	146	142	141	110	121
	Máximo	181	172	121	160	185
	Mínimo	184	117	70	70	72
T julho (°C)	Média	12,2	11,5	12,3	12,8	12,6
	Máximo	18,6	17,8	18,7	18,5	19,2
	Mínimo	5,8	5,3	6,5	6,1	6,5
T anual (°C)	Média	16,6	16,3	17,0	16,6	17,4
	Máximo	22,8	22,4	11,1	22,3	23,4

Mínimo	10,6	10,3	23,0	10,9	11,5
--------	------	------	------	------	------

FONTE: A autora (2021).
BIT: Bituruna; CAÇ: Caçador; CM: Cruz Machado; LAP: Lapa; SJT: São João do Triunfo; CT: Carboidratos Totais; AT: Amido total; AR: Amido resistente; FT: Fibra alimentar total; FI: Fibra alimentar insolúvel; FS: Fibra alimentar solúvel; CVT: Valor calórico total; Altitude, Precipitação, T julho e T anual são variáveis ambientais por Climate-data.org. *Média de repetições ± desvio padrão. As mesmas letras na linha não diferem pelo teste de Tukey (p < 0,05).

TABELA S2 - CONTRIBUIÇÃO PARA A DIETA RECOMENDADA (RDA) PARA O CONSUMO DE 100 G DE PINHÃO DE CADA UMA DAS SEIS LOCALIDADES DA REGIÃO SUL DO BRASIL

	RDA valor médio	RDA (%)					
		BIT	CAÇ	CM	LAP	SJT	
Proteína [†]	51 g	7,2	7,8	6,7	8,6	8,4	
P [†]	700 mg	32,7	27,1	25,2	42,0	28,5	
K [§]	3510 mg	27,1	20,8	17,1	30,6	21,8	
Ca ^{†,‡}	1000 mg	4,3	4,2	4,5	8,9	10,3	
Mg [‡]	240 mg	14,6	8,3	10,3	18,5	12,6	
Cu [†]	0,9 mg	46,7	43,7	46,2	41,8	31,7	
Fe [‡]	14 mg	14,0	9,0	12,9	10,5	10,9	
Mn [†]	2,1 mg	20,8	3,6	10,8	9,0	18,0	
Zn [†]	6 mg	22,5	21,1	20,4	24,5	22,1	

FONTE: A autora (2021).
Porção de 100 g de semente de pinhão cozida, base úmida, ~ 45% de umidade. Valor médio de RDA para homens e mulheres. †IOM (2005), ‡OMS/FAO (2004), §OMS (2012).

TABELA S3 - VALORES DE CARREGAMENTO PARA CADA VARIÁVEL EM RELAÇÃO À ANÁLISE DE CLUSTER

		v.test	Mean in category	Overall mean	sd in category	Overall sd	p.value
Cluster 1	b	3,269	-0,085	-0,132	0,002	0,027	0,001
	Cinza	2,738	-1,660	-1,758	0,046	0,067	0,006
	Umidade	2,644	1,111	1,005	0,035	0,075	0,008
	Precipitação	2,357	4,726	4,515	0,040	0,168	0,018
	TS	2,346	0,899	0,730	0,032	0,135	0,019
	Zn	2,342	-1,882	-1,970	0,014	0,070	0,019
	T anual	2,239	0,075	-0,028	0,040	0,086	0,025
	Proteína	2,210	-0,742	-0,883	0,025	0,120	0,027
	L	1,995	1,364	1,330	0,001	0,032	0,046
	Mg	-2,315	0,870	1,138	0,076	0,217	0,021
	A	-3,083	-1,279	-1,198	0,001	0,049	0,002
	Mn	-3,110	-4,723	-3,782	0,101	0,566	0,002
Cluster 2	Lipídio	2,437	-2,615	-3,041	0,047	0,327	0,015
	Fe	2,293	-1,609	-1,793	0,047	0,150	0,022
	P	-2,046	2,975	3,116	0,022	0,129	0,041
	K	-2,920	4,198	4,443	0,028	0,157	0,003
Cluster 3	P	3,389	3,350	3,116	0,002	0,129	0,001
	A	2,784	-1,124	-1,198	0,003	0,049	0,005
	Mg	2,758	1,458	1,138	0,091	0,217	0,006
	K	2,408	4,645	4,443	0,045	0,157	0,016
	Fe	-1,978	-1,952	-1,793	0,080	0,150	0,048
	T anual	-2,049	-0,121	-0,028	0,017	0,086	0,041
	Umidade	-2,491	0,905	1,005	0,018	0,075	0,013
	Precipitação	-2,901	4,255	4,515	0,017	0,168	0,004
	TS	-2,966	0,517	0,730	0,020	0,135	0,003
	L	-3,187	1,275	1,330	0,003	0,032	0,001
Cluster 4	AR	-3,485	-1,643	-1,388	0,062	0,137	0,000
	FS	2,712	-1,406	-1,824	0,043	0,288	0,007
	Ca	-2,036	1,414	1,832	0,205	0,385	0,042
	T anual	-2,129	-0,125	-0,028	0,021	0,086	0,033
	Proteína	-2,430	-1,039	-0,883	0,024	0,120	0,015
	FI	-2,604	-0,650	-0,442	0,139	0,150	0,009
	T Julho	-2,688	-0,433	-0,340	0,021	0,065	0,007
Cluster 5	Ca	2,606	2,368	1,832	0,049	0,385	0,009
	Lipídio	-2,822	-3,534	-3,041	0,033	0,327	0,005
	Cu	-2,948	-3,519	-3,234	0,073	0,181	0,003

FONTE: A autora (2021).

TABELA S4 – COMPOSIÇÃO DO SOLO DOS MUNICÍPIOS ENVOLVIDOS NO ESTUDO

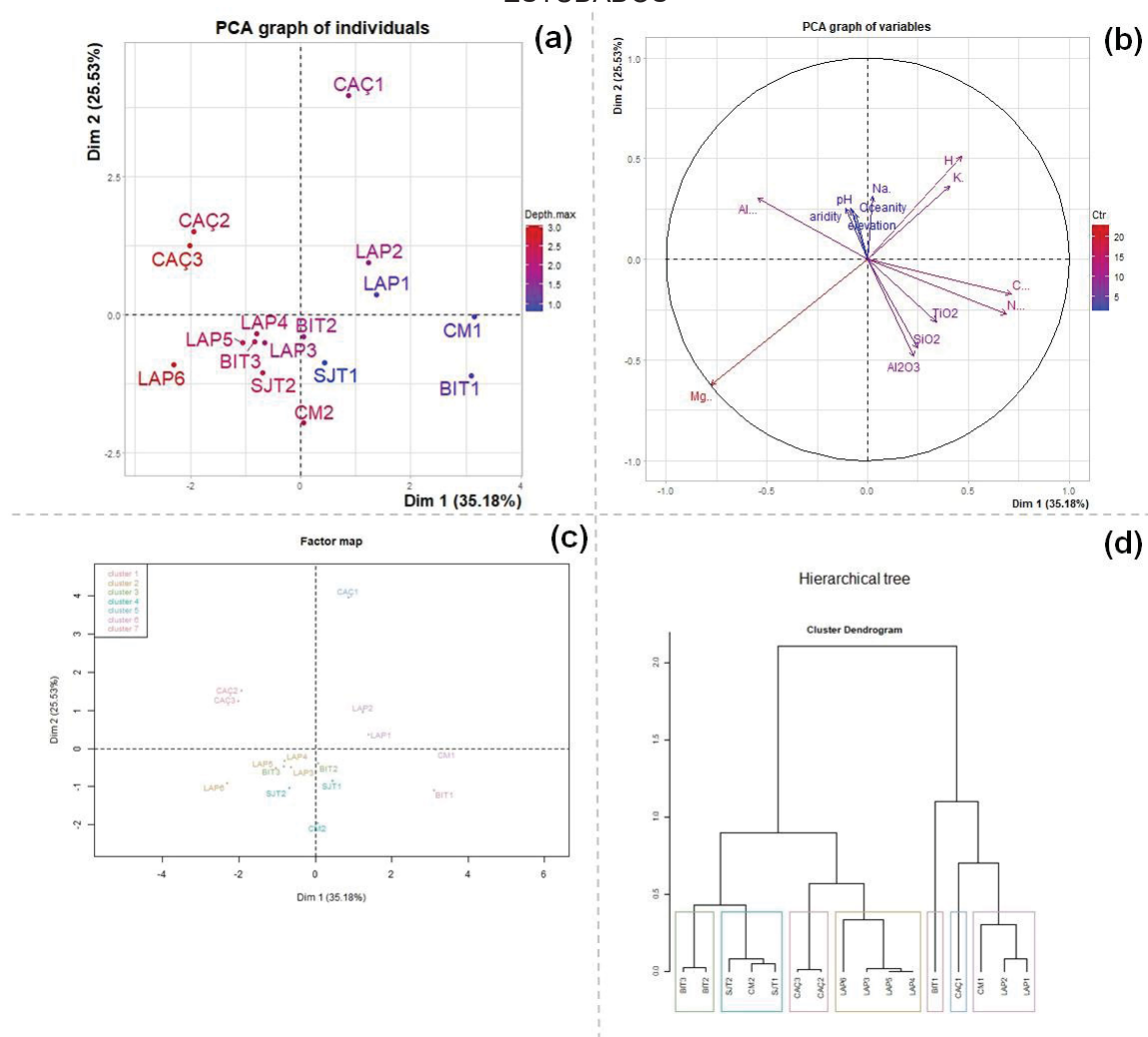
Observação	Profundidade (cm)	C (%)	N (%)	pH	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	H ⁺	Al ⁺⁺⁺	SiO ₂	Al ₂ O ₃	TiO ₂
BIT	0-25	38,3	5	5,4	4,2	0,2	0,2	9,7	0,1	289	178	21,5
BIT	25-75	17,3	2,6	6	6,1	0,1	0,1	5,4	0	255	149	31,5
BIT	75-120	7,7	1,3	6,2	7,6	0,1	0,2	4,8	0	313	212	25,6
CAÇ	0-25	4,7	0,4	4,9	0,2	0,2	0,1	13,5	5,2	21,7	19,5	2,6
CAÇ	35-60	2,3	0,2	5	0	0	0	5,9	3,6	24,9	21	2,8
CAÇ	70-90	2	0,2	5,2	0	0	0	4,7	1,8	25,3	22,6	2,6
CM	0-20	33,5	3,5	4,6	0,3	0,1	0	11,6	3,3	243	339	28,6
CM	60-120	17,4	1,9	4,7	0	0	0	7,6	4,1	281	263	28,1
LAP	0-17	20,7	1,7	5,4	1,9	0,1	0	7	1,2	107	135	3,7
LAP	17-37	13,2	1,3	4,8	0,5	0,1	0	6,1	3,5	109	152	4,6
LAP	37-50	9,9	0,9	4,9	0	0,1	0	4,6	3,4	121	162	5,3
LAP	50-73	7,6	0,6	4,9	0	0,1	0	4,2	2,5	117	164	5,3
LAP	73-79	5,8	0,5	4,9	0	0,1	0	3,3	2,2	132	179	5
LAP	79-120	1,8	0,4	4,9	0	0,1	0	0,3	4	136	173	3,6
LAP	160-200	0,5	0,4	5,1	0	0,1	0,1	3,8	4,7	209	160	3,3
SJT	0-20	39,2	3,5	4,2	0	0,1	0	9,2	9,6	129	199	9,5
SJT	60-120	16,8	1,5	4,9	0	0,1	0	3,4	11	137	232	12

FONTE: A autora (2021).

*meq/100g é miliequivalente por 100 g, equivalente a cmolc/L no SI. Dados obtidos no banco de dados da Embrapa Solos.

FIGURAS REFERENTES AO ITEM 4.1

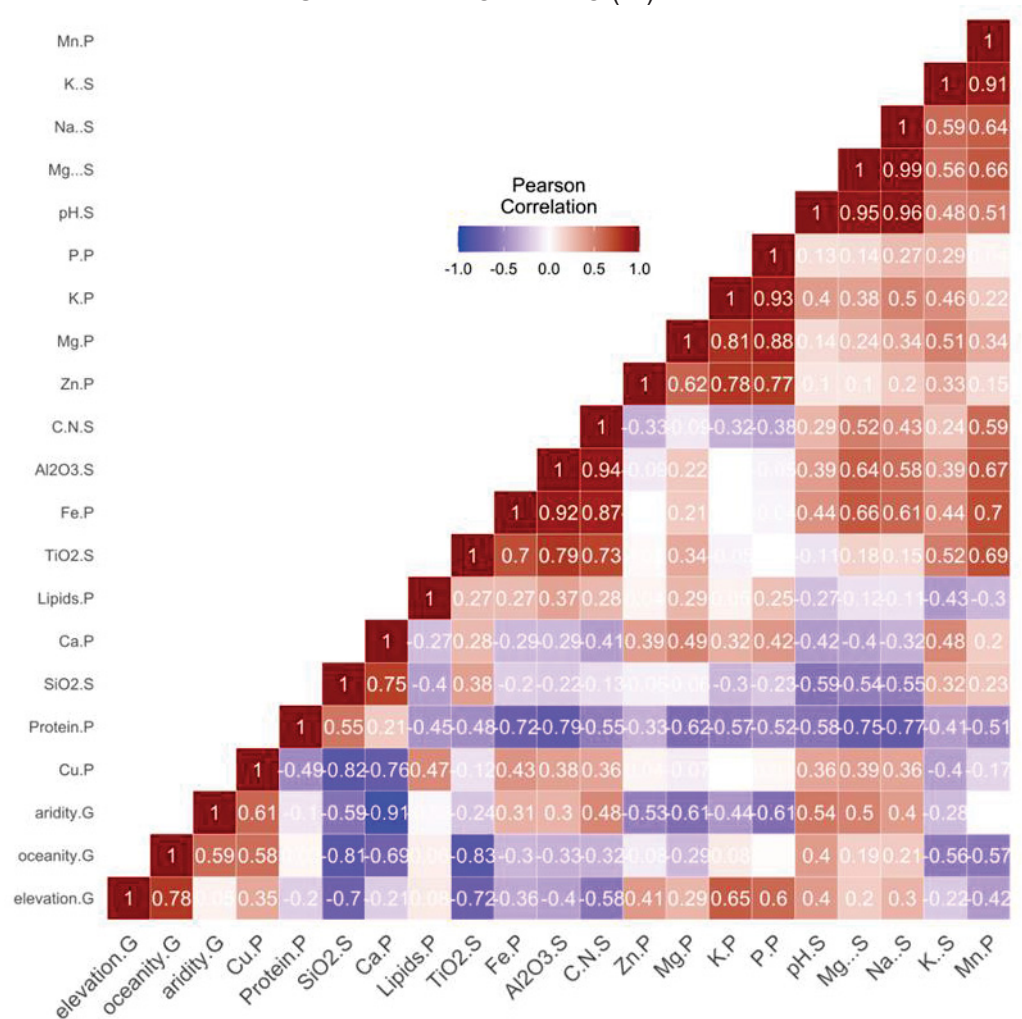
FIGURA S1 – PCA E ANÁLISE DE CLUSTER DOS DADOS DE SOLO DOS CINCO MUNICÍPIOS ESTUDADOS



FONTE: A autora (2021).

Os dados foram obtidos no banco de dados da Embrapa Solos, em diferentes profundidades.

FIGURA S2 - CORRELAÇÃO DE PEARSON COM OS DADOS DE SOLO (.S) EM ALTA PROFUNDIDADE (60-120 CM) ASSOCIADOS COM OS FATORES GEOGRÁFICOS (.G) E OS NUTRIENTES DO PINHÃO (.P)



FONTE: A autora (2021).

TABELAS REFERENTES AO ITEM 4.2

TABELA S5 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES DE CASCA DE PINHÃO PELO MÉTODO DE INFUSÃO

Ensaio	Variáveis codificadas			Respostas		
	G (µm)	S/S (%m/v)	t (min)	Fenóis observados (mg EAG/g) ¹	Fenóis Preditos ²	Rendimento (%v/v)
I1	225	4,17	5	63,99 ± 0,86	58,50	80,91
I2	567	4,17	5	25,65 ± 0,29	25,14	80,73
I3	225	12,50	5	48,29 ± 1,01	53,96	64,18
I4	567	12,50	5	25,22 ± 0,10	20,60	71,63
I5	225	4,17	30	69,65 ± 1,15	66,08	84,20
I6	567	4,17	30	26,11 ± 0,43	32,72	84,30
I7	225	12,50	30	61,10 ± 2,03	61,54	60,21
I8	567	12,50	30	35,63 ± 0,53	28,18	71,46
I9	362	8,33	17,5	41,34 ± 0,36	43,34	76,21
I10	362	8,33	17,5	42,81 ± 1,15	43,34	77,99
I11	362	8,33	17,5	39,97 ± 0,80	43,34	77,24

FONTE: A autora (2021).

I9, I10 e I11 são as repetições no ponto central. G: granulometria média (µm); S/S: porcentagem sólido em relação ao solvente (%m/v); t: tempo de extração (min); Fenóis: compostos fenólicos totais (mg de equivalente em ácido gálico/g amostra seca). ¹Observados experimentalmente; ²Obtidos pelo modelo experimental; rendimento em volume dos extratos em base úmida (%v/v).

TABELA S6 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴ E RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES DE CASCA DE PINHÃO PELO MÉTODO DE SHAKER

Ensaio	Valores codificados				Respostas		
	G (µm)	S/S (%m/v)	t (min)	T (°C)	Fenóis observados (mg EAG/g) ¹	Fenóis Preditos ²	Rendimento (%v/v)
S1	225	4,17	15	25	75,24 ± 1,62	77,77	83,60
S2	567	4,17	15	25	45,03 ± 0,55	40,79	86,36
S3	225	12,50	15	25	75,96 ± 0,46	71,09	63,01
S4	567	12,50	15	25	35,76 ± 0,76	39,79	73,78
S5	225	4,17	45	25	80,57 ± 0,91	83,19	84,01
S6	567	4,17	45	25	45,52 ± 0,36	46,21	87,59
S7	225	12,50	45	25	76,20 ± 1,83	76,51	64,32
S8	567	12,50	45	25	45,09 ± 0,43	45,21	71,92
S9	225	4,17	15	50	83,97 ± 3,11	86,21	81,92
S10	567	4,17	15	50	40,82 ± 1,19	43,83	82,67
S11	225	12,50	15	50	78,86 ± 0,12	79,53	64,86
S12	567	12,50	15	50	45,06 ± 2,41	42,83	68,80
S13	225	4,17	45	50	98,48 ± 5,30	91,63	81,02
S14	567	4,17	45	50	48,11 ± 0,36	49,25	83,57
S15	225	12,50	45	50	80,46 ± 0,61	84,95	56,98
S16	567	12,50	45	50	49,58 ± 0,55	48,25	70,09
S17	362	8,33	30	37,50	62,09 ± 0,52	62,94	78,64
S18	362	8,33	30	37,50	64,12 ± 1,01	62,94	80,20
S19	362	8,33	30	37,50	65,00 ± 0,46	62,94	80,42

FONTE: A autora (2021).

S17, S18 e S19 são as repetições no ponto central. G: granulometria média (µm); S/S: porcentagem sólido em relação ao solvente (%m/v); t: tempo de extração (min); Temperatura de extração (°C); Fenóis: compostos fenólicos totais (mg de equivalente em ácido gálico/g amostra seca). ¹Observados experimentalmente; ²Obtidos pelo modelo experimental; rendimento em volume dos extratos em base úmida (%v/v).

TABELA S7 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO DE MODELOS PREDITIVOS PARA A RESPOSTA DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

	Fonte	Coeficientes	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F - valor	P - valor
Infusão	G	-16,68	2225,12	1	2225,12	1104,79	< 10⁻⁴
	S/S	-2,27	41,18	1	41,18	20,45	0,045
	t	3,29	86,68	1	86,68	43,03	0,022
	G* S/S	3,79	115,15	1	115,15	57,17	0,017
	Falta de Ajuste		54,91	4	13,73	6,815	0,132
	Erro puro		4,03	2	2,01	-	
	Falta de Ajuste		2527,07	10		-	
Shaker	G	-18,42	5430,52	1	5430,52	2438,235	0,004
	S/S	-1,92	59,17	1	59,17	26,565	0,036
	t	2,71	117,22	1	117,22	52,633	0,018
	T	2,87	132,07	1	132,07	59,296	0,016
	G* S/S	1,42	32,46	1	32,46	14,572	0,062
	G*T	-1,35	29,24	1	29,24	13,127	0,068
	Falta de Ajuste		163,316	10	16,33	7,333	0,013
	Erro puro		4,45	2	2,22	-	
	Falta de Ajuste		5968,44	18		-	

FONTE: A autora (2021).

Em negrito as significativas. G: granulometria média (μm); S/S: porcentagem sólido em relação ao solvente (%m/v); t: tempo de extração (min); T: temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$), G*S/S e G*T: interações das variáveis. Em negrito as significativas. $R^2_{\text{Infusão}} = 0,99208$, erro puro da média dos quadrados $_{\text{Infusão}}$: 2,014061. $R^2_{\text{Shaker}} = 0,97189$, erro puro da média dos quadrados $_{\text{Shaker}}$: 2,227233.

TABELA S8 - RESULTADOS DOS EXTRATOS MAXIMIZADOS SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2³ (INFUSÃO) E 2⁴ (SHAKER)

	Fenólicos (mg EAG /g) ¹	
	Infusão	Shaker
Planejamento	69,00 $\pm$ 1,15 ^a	98,48 $\pm$ 5,30 ^a
Repetição 1	67,75 $\pm$ 3,75 ^a	90,75 $\pm$ 5,48 ^a
Repetição 2	66,49 $\pm$ 1,92 ^a	91,29 $\pm$ 4,03 ^a
Repetição 3	61,50 $\pm$ 1,73 ^a	96,52 $\pm$ 4,40 ^a

FONTE: A autora (2021).

Planeamento: Condição ótima; Repetição: Replicação de extratos na condição maximizada. Média de três réplicas $\pm$ desvio padrão. Subscritos iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

TABELA S9 - COMPOSTOS HIDROFÍLICOS DA CASCA DE PINHÃO IDENTIFICADOS CG/MS

IR	Identificação	Classe	m/z (1)	m/z (2)	m/z (3)	Casca (µg/g)
1234,6	Uréia	Amida	189	171	147	107,93
1524,5	Ácido 4-amino-butanóico	Amina	304	216	174	18,69
1352,4	Alanina	Aminoácido	290	262	188	4,71
1516,3	Ácido pirogutâmico	Aminoácido	258	230	156	7,22
1522,8	Cis - 4 - hidroxí - prolina	Aminoácido	332	230	140	8,67
1548,8	Fenilalanina	Aminoácido	266	218	192	3,11
1155,8	Álcool benzílico	Aromático	180	165	135	548,19
1820,1	D-Pinitol	Ciclitól	318	260	217	298,18
1952,2	Ononitol	Ciclitól	318	260	217	25,72
2081,2	Myo-inositol	Ciclitól	318	305	217	28,51
1053,1	Ácido láctico	Ácido Orgânico	219	191	147	90,97
1076,6	Ácido glicólico	Ácido Orgânico	205	177	147	9,17
1311,1	Ácido succínico	Ácido Orgânico	247	172	147	13,53
1481,5	Ácido málico	Ácido Orgânico	335	245	233	1,99
1849,6	Ácido quínico	Ácido Orgânico	372	345	255	3,60
1334,1	Uracilo	Nitrogênio orgânico	255	241	99	1,85
1624,3	Ácido 4-hidroxí-benzóico	Fenol	282	267	223	19,34
1760,1	Ácido vanílico	Fenol	312	297	282	3,41
1813,6	Ácido 3,4-dihidroxí-benzóico (Ácido protocatecuico)	Fenol	370	355	193	368,85
1948,7	Ácido gálico	Fenol	458	443	281	37,96
2091,5	Ácido trans - ferúlico	Fenol	338	323	308	0,53
2555,2	Threo - guaiacil-glicerol - beta - O - 4' - acetovanilona	Fenol	297	223	201	3,63
2572,3	Eritro - guaiacil-glicerol - beta - O - 4' - acetovanilona	Fenol	297	223	201	3,99
2856,1	Epicatequina	Fenol	650	368	355	373,15
2868,7	Catequina	Fenol	650	368	355	1359,14
2412	Epigalocatequina	Fenol	648	456	355	44,71
2919,9	Galocatequina	Fenol	648	456	355	73,39
3160,9	Quercetina	Fenol	647	559	487	304,07
1266,0	Ácido fosfórico	Fosfato	314	299	283	78,00
1652,1	Ribose	Açúcar	307	277	217	3,41
1652,4	Lixose	Açúcar	307	277	217	4,07
1656,0	Arabinose	Açúcar	307	277	217	30,48
1862,0	Frutose	Açúcar	364	307	217	803,10
1887,9	Glicose	Açúcar	319	217	205	512,60
1972	Glucopiranoze	Açúcar	217	204	191	1,14
2624,9	Sacarose	Açúcar	437	361	217	976,30
1981,2	Ácido galactônico	Açúcar ácido	333	319	292	2,02
1490,6	Threitol	Álcool de açúcar	320	217	205	34,49
1500,2	Eritritol	Álcool de açúcar	320	217	205	495,70
1818,7	Manitol	Álcool de açúcar	421	319	217	352,89

1923,1	Sorbitol	Álcool de açúcar	421	319	217	55,07
1806,9	RI=1806,9, 18,1315 min TAM758	Desconhecido	318	260	247	1155,46
1835,4	RI=1835,4, 18.5029 min TAM758	Desconhecido	276	244	159	168,99

FONTE: A autora (2021).

IR: Índice de retenção; m/z: relação massa/carga em Dalton (Da).

TABELA S10 - COMPOSTOS LIPOFÍLICOS DA CASCA DE PINHÃO IDENTIFICADOS CG/MS

IR	Identificação	Classe	m/z (1)	m/z (2)	m/z (3)	Casca (µg/g)
2546,4	Docosanol	Álcool	383	111	97	527,70
2743,6	Tetracosanol	Álcool	411	111	97	574,80
2873,6	8 - Heptacosanol	Álcool	453	369	201	569,86
2939,6	Hexacosanol	Álcool	439	111	97	266,99
1724,3	Ácido tetradecanóico (ácido mirístico)	Ácido carboxílico	242	199	143	171,79
2018,6	Ácido heptadecanóico (ácido margárico)	Ácido carboxílico	284	199	143	164,48
2094,7	Ácido 9,12-(Z,Z)-octadecadienóico (ácido 9,12-linoleico)	Ácido carboxílico	294	262	220	1533,67
2101,7	Ácido 9-(Z)-octadecenóico (ácido oleico)	Ácido carboxílico	296	264	222	1564,47
2257,2	Ácido v,w,x,y,z-eicosapentaenóico (ácido eicosapentaenóico)	Ácido carboxílico	147	105	91	157,83
2272,7	Ácido x,y,z-eicosatrienoico	Ácido carboxílico	135	121	91	452,08
2295,4	Ácido 8,11-(Z,Z)-eicosadienóico	Ácido carboxílico	322	290	192	13,72
2328,2	Ácido eicosanóico	Ácido carboxílico	326	199	143	578,93
2530,0	Ácido docosanóico	Ácido carboxílico	354	199	143	876,84
2730,6	Ácido tetracosanóico	Ácido carboxílico	382	199	143	1818,64
2832,5	Ácido pentacosanóico	Ácido carboxílico	396	199	143	214,92
2932,3	Ácido hexacosanóico	Ácido carboxílico	410	199	143	981,46
2342,5	Ácido 13-isopropil-podocarpa-6,8,11,13-tetraen-15-óico	Diterpeno	312	237	197	2472,35
2345,7	Ácido 13-isopropil-podocarpa-8,11,13-trien-15-óico (ácido desidroabiético)	Diterpeno	314	299	239	716,87
2584,6	Ácido 7-oxo-desidroabiético	Diterpeno	328	296	253	533,72
3230,9	24-metil-colest-5-en-3β-ol (campesterol)	Esterol	472	382	343	1709,90
3312,8	24-etilcolest-5-en-3β-ol (β-sitosterol)	Esterol	486	396	357	19076,84
3401,5	3b - metoxi - oleano - 12 - eno (b - éter metílico de amirina)	Triterpeno	218	203	189	427,43
2706,1	Ácido 2-hidroxidocosanóico		427	383	159	240,76
2804,6	2 - ácido hidroxitricosanóico	α-hidroxiácido	441	397	159	501,73
2904,1	Ácido 2-hidroxitetracosanóico		455	411	159	2337,06
2999,1	2 - ácido hidroxipentacosanóico	α-hidroxiácido	469	425	159	757,22
3091,9	2 - ácido hidrohexacosanóico		483	439	159	357,49

FONTE: A autora (2021).

IR: Índice de retenção; m/z: relação massa/carga em Dalton (Da).

TABELA S11 – DIGESTIBILIDADE GASTROINTESTINAL *IN VITRO* DOS IOGURTES ADICIONADOS DE EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO EM RELAÇÃO AOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS, E POTENCIAL ANTIOXIDANTE POR ABTS, DPPH E FRAP, EXPRESSOS EM BASE SECA DE IOGURTE

Parâmetros	Formulações de iogurte	Controle	Fase gástrica	Fase intestinal
Fenólicos (mg EAG/100 g)	Padrão	1,28 ± 0,08 ^{Cb}	326,19 ± 2,26 ^{Bb}	450,83 ± 3,12 ^{Ab}
	+ Extrato	2,41 ± 0,17 ^{Ca}	349,67 ± 11,61 ^{Ba}	487,50 ± 19,93 ^{Aa}
Flavonoides (mg EC/100 g)	Padrão	32,20 ± 4,24 ^{Ca}	62,45 ± 2,05 ^{Ba}	124,09 ± 5,06 ^{Ab}
	+ Extrato	38,19 ± 0,92 ^{Ca}	64,60 ± 4,68 ^{Ba}	232,97 ± 15,61 ^{Aa}
ABTS (μmol ET/ 100 g)	Padrão	696,78 ± 0,48 ^{Bb}	503,10 ± 42,02 ^{Cb}	6161,12 ± 22,38 ^{Ab}
	+ Extrato	838,09 ± 55,41 ^{Ba}	880,55 ± 54,98 ^{Ba}	11695,45 ± 44,73 ^{Aa}
DPPH (μmol ET/ 100 g)	Padrão	76,25 ± 2,97 ^{Cb}	215,20 ± 20,62 ^{Ab}	160,69 ± 5,33 ^{Bb}
	+ Extrato	164,50 ± 14,35 ^{Ca}	556,81 ± 12,32 ^{Ba}	709,55 ± 8,93 ^{Aa}
FRAP (μmol ET/ 100 g)	Padrão	0,00 ± 0,00 ^{Cb}	44,93 ± 3,50 ^{Bb}	456,54 ± 51,31 ^{Ab}
	+ Extrato	113,21 ± 3,20 ^{Ca}	238,94 ± 8,88 ^{Ba}	1443,12 ± 38,07 ^{Aa}

FONTE: A autora (2022).

Letras maiúsculas: efeito da digestão. Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas: comparação das formulações em cada etapa (Controle, Gástrica e Intestinal). Sobrescrito diferente indica diferenças significativas entre as amostras pelo teste T ($p < 0,05$).

TABELAS REFERENTES AO ITEM 4.3

TABELA S12 - BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DOS IOGURTES ADICIONADOS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5, E 10%) E ETAPAS (ANTES OU DEPOIS DA FERMENTAÇÃO), JUNTAMENTE COM EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO (ECP) APÓS A FERMENTAÇÃO EM TODAS FORMULAÇÕES, EXCETO SP₀

Formulações de iogurte <i>in natura</i>						
	SP ₀	SP ₅ Antes	SP ₁₀ Antes	SP ₅ Depois	SP ₁₀ Depois	Pinhão
Fenólicos (mg EAG/100 g, bs)	C	1,25 ± 0,08 ^{Bd}	5,17 ± 0,46 ^{Cc}	10,09 ± 0,93 ^{Ba}	4,42 ± 0,27 ^{Cc}	7,57 ± 0,31 ^{Cb}
	G	327,00 ± 2,26 ^{Aa}	331,90 ± 19,71 ^{Ba}	258,06 ± 27,25 ^{Ab}	339,40 ± 18,47 ^{Ba}	351,44 ± 13,99 ^{Ba}
	I	345,41 ± 27,64 ^{Ad}	533,73 ± 32,96 ^{Ab}	245,60 ± 11,91 ^{Ae}	642,92 ± 15,84 ^{Aa}	431,33 ± 26,11 ^{Ac}
Flavonoides (mg EC/100 g, bs)	C	32,77 ± 3,16 ^{Ca}	27,47 ± 2,51 ^{Cb}	37,79 ± 3,65 ^{Ca}	39,10 ± 2,18 ^{Ca}	38,92 ± 2,62 ^{Ca}
	G	62,45 ± 2,05 ^{Bb}	96,50 ± 7,89 ^{Ba}	75,06 ± 3,12 ^{Bb}	86,31 ± 7,24 ^{Ba}	88,47 ± 6,71 ^{Ba}
	I	116,28 ± 2,70 ^{Ab}	140,27 ± 10,37 ^{Aa}	134,90 ± 11,93 ^{Aab}	130,84 ± 8,12 ^{Aab}	127,01 ± 7,16 ^{Aab}
ABTS (μmol ET/ 100 g, bs)	C	691,10 ± 9,86 ^{Bd}	953,02 ± 10,56 ^{Cc}	1166,67 ± 33,93 ^{Cb}	1007,38 ± 64,75 ^{Cc}	1338,16 ± 26,21 ^{Ca}
	G	494,01 ± 42,02 ^{Cd}	1375,03 ± 131,15 ^{Bc}	1980,74 ± 96,39 ^{Ba}	1629,42 ± 26,05 ^{Bb}	1930,11 ± 53,50 ^{Ba}
	I	6152,02 ± 22,38 ^{Ae}	9580,14 ± 14,11 ^{Aa}	8925,74 ± 34,18 ^{Ac}	9371,14 ± 60,11 ^{Ab}	7930,71 ± 44,22 ^{Ad}
DPPH (μmol ET/ 100 g, bs)	C	78,50 ± 5,08 ^{Cd}	249,43 ± 16,64 ^{Bc}	312,93 ± 11,73 ^{Cb}	242,30 ± 6,39 ^{Cc}	326,55 ± 10,90 ^{Ca}
	G	186,61 ± 11,41 ^{Bd}	602,68 ± 25,71 ^{Ac}	762,39 ± 20,07 ^{Ab}	616,92 ± 41,50 ^{Bc}	873,79 ± 26,99 ^{Aa}
	I	238,48 ± 24,28 ^{Ac}	578,72 ± 20,58 ^{Ab}	546,84 ± 31,40 ^{Bb}	768,05 ± 13,83 ^{Aa}	719,27 ± 25,59 ^{Ba}
FRAP (μmol ET/ 100 g, bs)	C	0,00 ± 0,00 ^{Cd}	26,94 ± 1,06 ^{Cc}	131,31 ± 10,03 ^{Ca}	46,39 ± 4,13 ^{Cb}	128,75 ± 3,72 ^{Ca}
	G	46,71 ± 1,71 ^{Bd}	424,48 ± 9,93 ^{Bb}	335,86 ± 16,88 ^{Bc}	441,14 ± 17,56 ^{Bab}	465,36 ± 21,89 ^{Ba}
	I	456,54 ± 51,31 ^{Ac}	884,36 ± 104,16 ^{Ab}	1021,57 ± 21,73 ^{Aab}	1038,15 ± 42,13 ^{Aa}	1124,73 ± 22,09 ^{Aa}

FONTE: A autora (2022).

Bs: base seca. Letras maiúsculas em coluna: efeito da digestão. Letras minúsculas em linha: comparação das formulações em cada fase (controle (C), gástrica (G) e intestinal (I)). Diferentes sobrescritos indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste T (p < 0,05).

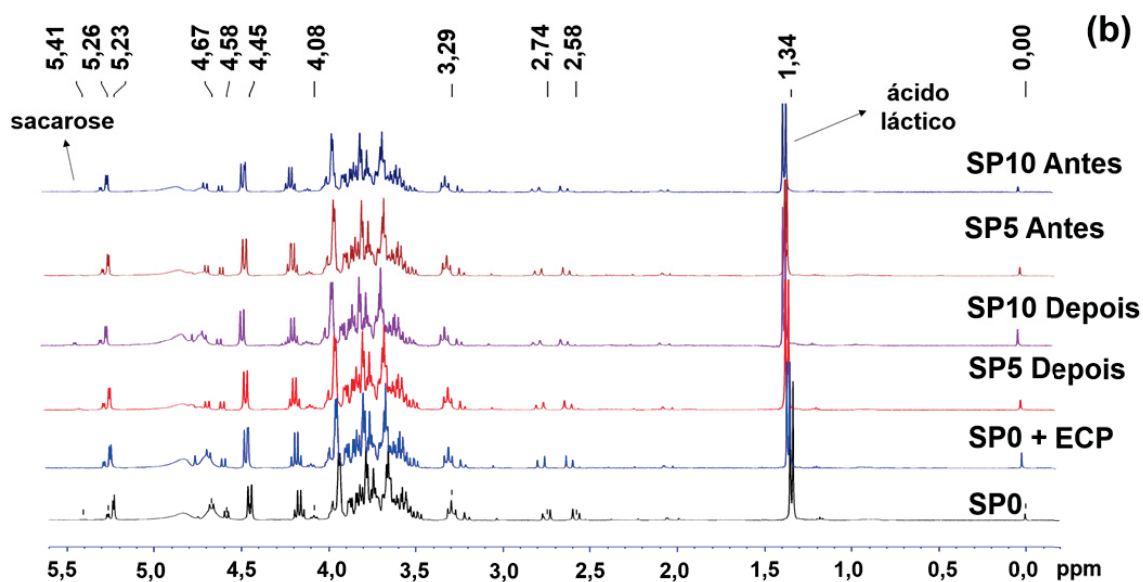
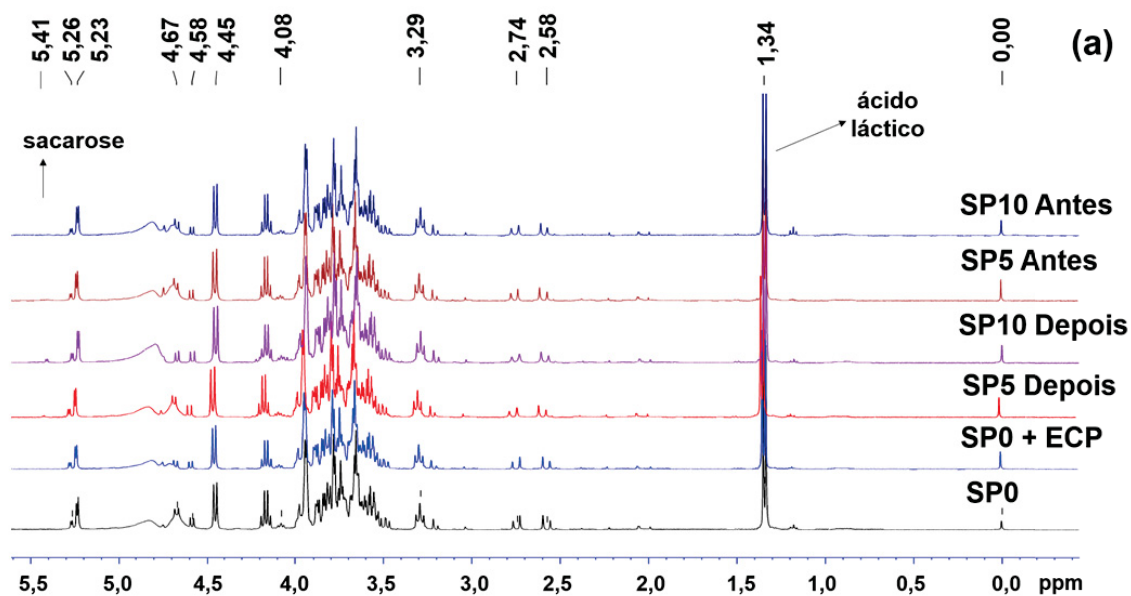
QUADRO S1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS IOGURTES ADICIONADOS DE SEMENTE DE PINHÃO (SP), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0, 5 E 10%) E ETAPAS (ANTES E DEPOIS) DA FERMENTAÇÃO, COMBINADO COM EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO (ECP) POR RMN ^1H

		SP ₀		P0 + ECP		SP5 Depois		SP10 Depois		SP5 Antes		SP10 Antes	
Composto	^1H multiplicity J (Hz)	0	30	0	30	0	30	0	30	0	30	0	30
α -lactose	δ 4,45 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
β - lactose	δ 4,45 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
β - lactose	δ 4,67 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
α -lactose	δ 5,23 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
α -galactose	δ 5,26 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
β - galactose	δ 4,58 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sacarose	δ 5,41 d	ND	ND	ND	ND	*	*	**	**	ND	ND	ND	ND
Ácido cítrico	δ 2,58 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ácido cítrico	δ 2,75 d	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ácido láctico	δ 1,33 (d 6,9)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ácido láctico	δ 4,16 (q 6,9)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lecitina	δ 3,22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

FONTE: A autora (2022).

*presença do composto na formulação, ** aumento, ND não detectado.

FIGURAS REFERENTES AO ITEM 4.3

FIGURA S3 - ANÁLISE QUÍMICA DE RMN EM ^1H DOS SOROS DE IOGURTE *IN NATURA* NOS TEMPOS 0 (A) E 30 DIAS (B) DE ESTOCAGEM

FONTE: A autora (2022).

ANEXO A – LISTA DO LOCAL DAS ANÁLISES

Análises	Laboratórios	Local
Preparação das amostras, umidade, cinzas, proteína, lipídios, fibras alimentares, análises de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e fitoesteróis.	Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais Não Madeiráveis.	Núcleo de Tecnologia de Produtos Florestais, Embrapa Florestas, Colombo/PR.
Moagem da casca e semente dos pinhões.	Laboratório de Tecnologia da Madeira.	Núcleo de Tecnologia de Produtos Florestais, Embrapa Florestas, Colombo/PR.
Minerais.	Laboratório de Nutrição Florestal e Água.	Núcleo de Solos e Ciclos Biogeoquímicos, Embrapa Florestas, Colombo/PR.
Extração dos compostos da casca de pinhão, fenólicos totais dos extratos.	Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS).	Usina B – Centro Politécnico, UFPR.
Atividade antioxidantes, flavonoides e taninos condensáveis.	Laboratório de Engenharia de Processos em Sistemas Particulados (LEPSP).	Usina A – Centro Politécnico, UFPR.
Toxicidade.	Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LABTECAL).	Usina B – Centro Politécnico, UFPR.
Reologia.	Laboratório de Emulsões (Emultec).	Usina B – Centro Politécnico, UFPR.
Elaboração do iogurte, rendimento dos extratos da casca de pinhão, pH, acidez e sinérese do iogurte.	Laboratório de Inovação e Otimização de Produto e Processo (LIOPP).	Usina B – Centro Politécnico, UFPR.
Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> e análise de bioativos em microplaca.	Laboratório de pós-graduação em alimentação e nutrição.	Departamento de Nutrição – UFPR.