

## DEDICO

Ao único que é digno de receber a honra, a glória, o louvor, a adoração e a majestade (cf. Judas 1:25): **Jesus Cristo**, o Rei dos reis e Senhor dos senhores (Apocalipse 19:16), o Alfa e o Ômega (Apocalipse 22:13) , o autor e consumidor da fé (Hebreus 12:2). “Porque Dele, por meio Dele e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36).

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus Todo Poderoso ( também revelado nas Escrituras Sagradas pelos nomes de Adhonai, El Shaddai, El Elohim, Elyon, Yaveh, “EU SOU”, dentre outros ), pela graça da salvação por meio de Seu Filho Jesus Cristo e pela conclusão de mais esta etapa de estudos;

A amada esposa Aura Cristina, pelo auxílio em toda a parte experimental dessa dissertação e por tudo mais...;

Aos meus “pais espirituais” Toninho e Cleise, por me apresentarem o Propósito Eterno de Deus (cf. Romanos 8:28 e 29) e me incentivarem a perseverar na nova vida à semelhança de Jesus Cristo; bem como a todos os meus irmãos: Família Eterna de Deus;

Aos meus pais: Antônio Wagner e Sueli e ao meu irmão Rogério, pelo incentivo aos estudos e ao trabalho;

Ao Prof. Dr. Cláudio Cabello, pela orientação nesta dissertação, por estar me ensinando os caminhos da pesquisa científica, sendo um exímio exemplo de pesquisador;

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silene Bruder S. Sarmiento e a técnica Carlota Borralli dos Anjos por terem colaborado na realização das análises viscosográficas no RVA;

Ao Hernani de Meira Pereira, pelo zelo com o qual adquire e compartilha seus conhecimentos científicos;

A equipe do Cerat, pela amizade e tempo de convívio; e a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1 INTRODUÇÃO.....	05
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1 Grânulo de amido .....	10
2.2 Biopolímeros .....	14
2.3 Cromatografia de permeação em gel .....	19
2.4 Características viscosográficas da pasta de amidos .....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Concentração de amido nas féculas.....	31
3.1.1 Hidrólise das amostras de fécula .....	31
3.1.2 Determinação da concentração de Carbono Orgânico Total (TOC).....	32
3.2 Preparo inicial das amostras .....	32
3.3 Dissolução das amostras para permeação.....	32
3.3.1 Ensaio com solução de dimetilsulfóxido (DMSO).....	33
3.3.2 Ensaio com solução de hidróxido de sódio (NaOH) .....	33
3.3.3 Ensaio com solução de hidróxido de sódio e enzima isoamilase .....	34
3.4 Preenchimento das colunas.....	35
3.5 Permeação das amostras nas colunas cromatográficas .....	36
3.6 Curva de calibração dos tamanhos de moléculas.....	37
3.7 Análises para caracterização das frações coletadas .....	39
3.7.1 Concentração de carboidratos.....	39
3.7.2 Afinidade ao reagente iodato .....	40
3.7.3 Concentração de açúcares redutores .....	40
3.8 Concentração de amilose e amilopectina nas féculas .....	40

3.9 Metodologia para análises viscosográficas .....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Ensaio de permeação em gel .....	43
4.2 Concentração de amido nas féculas .....	64
4.3 Concentração de amilose e amilopectina na fécula .....	68
4.4 Análises viscosográficas das féculas .....	69
5 CONCLUSÕES .....	76
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
1 Raio de giração e peso molecular médio de amilopectinas de milho e batata.....	19
2 Identificação das amostras de féculas de mandioca.....	30
3 Informações sobre padrões de proteínas e carboidrato de alto peso molecular .....	37
4 Informações sobre padrões de proteínas de baixo peso molecular .....	38
5 Principais resultados experimentais obtidos nos ensaios preliminares de permeação das amostras no gel Sephacryl S-500.....	49
6 Valores de Kav dos picos das amostras eluídas e respectivos valores de carboidratos (em mg/mL e GP) e comprimento de onda de absorção máxima ( em nm ). .....	56
7 Distribuição percentual das áreas dos picos correspondentes às cadeias das amiloses e das cadeias ramificadas das amilopectinas de cada amostra permeada .....	62
8 Valores da porcentagem de amido hidrolisado e concentração de carbono orgânico em função do tempo de hidrólise .....	65
9 Concentração de amilose das amostras de féculas.....	68
10 Parâmetros viscoamilográficos médios obtidos pelo RVA nos ensaios das amostras de féculas.....	73

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
1 Estrutura do grânulo de amido, segundo Gallant et al. (1997) .....	13
2 Organização molecular das amilopectinas, segundo Smith et al. (1997). .....	14
3 Modelo de cluster proposto para amilopectinas (FRENCH, 1984). .....	17
4 Curva típica de uma amostra de amido obtida utilizando um RVA. ....	28
5 Perfil de eluição da amostra A3 dissolvida em NaOH .....	44
6 Perfil de eluição da amostra A3 dissolvida em DMSO (Dimetilsulfóxido) .....	45
7 Perfil de eluição da amostra A4 dissolvido em NaOH .....	47
8 Perfil de eluição da amostra A6 dissolvida em NaOH .....	48
9 Perfil de eluição com as frações da amostra A4 dissolvidas em NaOH e complexadas com o reagente iodato, medidos a 540 e 620 nm.....	45
10 Perfil de eluição da amostra A6 em gel Sephacryl S-500, com fluxo da fase móvel em 20 mL/h.....	50
11 Perfil de eluição da amostra A6 em Sephacryl S-1000 com fluxo da fase móvel em 20 mL/h.....	51
12 Perfil de eluição da amostra A1 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção. ....	52
13 Perfil de eluição da amostra A2 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção. ....	53

14 Perfil de eluição da amostra A3 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.....	53
15 Perfil de eluição da amostra A4 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.....	54
16 Perfil de eluição da amostra A5 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.....	54
17 Perfil de eluição da amostra A6 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.....	55
18 Perfil de eluição da amostra A7 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.....	55
19 Curva de calibração com moléculas de proteínas permeadas em gel Sepharose CL-2B...	57
20 Perfil de eluição da amostra A1 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.....	58
21 Perfil de eluição da amostra A2 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.....	59
22 Perfil de eluição da amostra A3 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.....	59
23 Perfil de eluição da amostra A4 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.....	60
24 Perfil de eluição da amostra A5 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.....	59
25 Perfil de eluição da amostra A6 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.....	61

26 Perfil de eluição da amostra A7 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção .....	61
27 Gráfico da variação da concentração de amido hidrolisado e do carbono orgânico das amostras em função do tempo e a medida do TOC teórica .....	66
28 Perfis viscoamilográficos da amostra A1 .....	69
29 Perfis viscoamilográficos da amostra A2 .....	70
30 Perfis viscoamilográficos da amostra A3 .....	70
31 Perfis viscoamilográficos da amostra A4 .....	71
32 Perfis viscoamilográficos da amostra A5 .....	71
33 Perfis viscoamilográficos da amostra A6 .....	72
34 Perfis viscoamilográficos da amostra A7 .....	72



## RESUMO

A fécula de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) contém aproximadamente 98 % de amido, em peso seco. Este amido é constituído por dois tipos de polissacarídeos: a amilose ( de 16 a 20 % ), com cadeias lineares de monômeros de glicose e peso molecular  $1,5 \cdot 10^5$  a  $1,0 \cdot 10^6$  Da; e amilopectina ( de 80 a 84 % ), com cadeias ramificadas e peso molecular  $5,0 \cdot 10^6$  a  $1,0 \cdot 10^8$  Da.

A estrutura molecular desses polissacarídeos influi diretamente nas propriedades funcionais dos amidos, as quais são interessantes para diversos usos industriais.

O principal objetivo desta pesquisa é avaliar e adaptar a técnica de separação de moléculas conhecida por cromatografia de permeação em gel, seguida da caracterização das frações coletadas na permeação e verificar as propriedades viscosográficas do amido.

Nesta principal técnica utilizada, conhecida também por cromatografia por exclusão de tamanho, as moléculas se separam de acordo com seus tamanhos e pesos moleculares. Sendo assim, moléculas maiores que os poros do gel, saem primeiro da coluna, enquanto moléculas de tamanhos intermediários aos dos poros do gel, saem no final da permeação.

As amostras usadas neste trabalho foram féculas extraídas de sete etnovariedades de mandioca, que foram previamente tratadas e posteriormente solubilizadas

em solventes adequados e injetadas na coluna de permeação contendo um gel de porosidade pré-determinada.

Foi usado um sistema completo para permeação em gel, contendo colunas, géis, coletor automático das frações permeadas, bomba peristáltica, kit de proteínas e carboidrato padrão, dentre outros acessórios fornecidos pela Amersham Pharmacia Biotech.

Empregou-se solventes P.A. e enzima pura (Sigma-Aldrich); equipamento analisador de carbono (TOC), marca Shimadzu e espectrofotômetro UV-visível com varredura de 190 a 1100 nm, marca Varian.

Para se estimar os pesos moleculares dos polissacarídeos coletados nas frações, foram feitos cálculos dos tempos de eluição e comparações com as proteínas e carboidrato de pesos moleculares conhecidos.

Dentre as amostras permeadas, observou-se que algumas delas não apresentaram a presença de dois tipos de moléculas diferentes quanto às estruturas.

Concluiu-se que o melhor solvente para desramificar polissacarídeos foi etanol e solução diluída de hidróxido de sódio; o melhor gel para a permeação foi o Sepharose CL-2B e o melhor fluxo da fase móvel foi 20 mL/h. Não foi possível encontrar correlação entre estrutura molecular e propriedades viscosográficas dos amidos.

CHARACTERIZATION OF MOLECULAR STRUCTURE AND  
VISCOGRAPHICS PROPERTIES OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz)  
STARCHES FOR INDUSTRIAL APLICATIONS

Botucatu, 2004. 85 p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: FÁBIO IACHEL DA SILVA

Adviser: CLÁUDIO CABELLO

**SUMMARY**

Cassava starch ( *Manihot esculenta* Crantz ) contains approximately 98 % of starch in dry weight. This starch is constituted of two polysaccharide: amylose ( 16 to 20% ), with lineal chains of glucose monomers and molecular weight  $1,5 \cdot 10^5$  to  $1,0 \cdot 10^6$  Da; and amylopectin ( 80 to 84% ), with ramified chains and molecular weight from  $5,0 \cdot 10^6$  to  $1,0 \cdot 10^8$  Da.

The molecular structure of these polysaccharides influences directly the functional properties of the starches, which are interesting for several industrial uses.

The main objective of this research is to evaluate and to adapt the technique of separation of molecules known by gel permeation chromatography, followed by

the characterization of the fractions collected in the permeation and to verify the viscographic properties of the starch.

In this main used technique, also known by size exclusion chromatography, the molecules are separated in agreement with sizes and molecular weights. So, molecules larger than the pores of the gel, leave the column first, while molecules of intermediary sizes come out in the end of the permeation.

The samples used in this work were starches extracted from seven cassava ethnovarieties, that were previously treated and then dissolved in appropriate solvents and injected in the permeation column that was filled with a gel of defined porosity.

A complete system for gel permeation was used, constituted of columns, gels, automatic collector, peristaltic pump, kit of proteins and standard carbohydrate, among other accessories supplied by Amersham Pharmacia Biotech.

Solvents (for analysis) and pure enzyme (Sigma-Aldrich) were used; equipment to analyze organic carbon (TOC), from Shimadzu and UV-visible spectrophotometer with scanning from 190 to 1100 nm, from Varian were employed.

To estimate the molecular weights of the polysaccharides, were collected several fractions and calculations of the times of elution were made as well as comparisons with the proteins and carbohydrate of known molecular weights.

In the permeated samples, it was observed that some of them didn't present two kinds of molecules with relationship to the structures.

It was concluded that the best solvent to debranch polysaccharides was ethanol and diluted solution of sodium hidroxide; the best gel for the permeations was Sepharose CL-2B and the best flow of the mobile phase was 20 mL/h. It wasn't possible to find correlation between molecular structures and viscographic properties of the starches.

---

Keywords: cassava, starch, gel permeation, molecular structure.

## 1 INTRODUÇÃO

O amido é um dos mais importantes biopolímeros utilizados para modificar alimentos, melhorando inclusive suas características sensoriais. Sendo um componente natural, contribui para realçar propriedades características de alimentos feitos a partir de cereais e tuberosas amiláceas. Também é adicionado para agir como ingrediente funcional em molhos, pudins, produtos de confeitaria, embutidos cárneos e substituto de gorduras numa grande variedade de produtos (THOMAS; ATWELL, 1999).

Segundo Biliaderis (1991) amidos de diferentes fontes botânicas são freqüentemente adicionados a alimentos para incrementar a viscosidade e estabilidade e também contribuir na manutenção de sua estrutura melhorando o aspecto e a palatabilidade. Recentes pesquisas buscam a aplicação de amidos para reter e liberar aromas em alimentos.

As propriedades funcionais dos amidos têm significativa importância para as indústrias de alimentos que buscam manter e/ou realçar as propriedades dos seus produtos mesmo após estocagens e refrigerações. Frequentemente nestes casos buscam amidos com propriedades diferenciadas, pois modificar formulações é mais viável economicamente do que alterar processos de fabricação (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

As características estruturais dos biopolímeros que compõem os amidos são parcialmente conhecidas e muitos estudos são elaborados visando compreender melhor semelhanças e diferenças apresentadas pela aplicação de amidos de diferentes fontes em alimentos. Supõe-se que muitas propriedades funcionais apresentadas pelos alimentos

compostos por amidos são decorrentes dessas diferentes estruturas. A mais visível delas está associada às concentrações relativas das amiloses e amilopectinas apresentadas pelos amidos, que *a priori* indicam a aplicação mais específica. Amido com altos teores de amilopectinas aplicados a alimentos conferem-lhes maior resistência à retrogradação quando estocados a baixas temperaturas (THOMAS; ATWELL, 1999). As características dos amidos dependem principalmente da planta onde foi produzido e estocado.

As propriedades funcionais dos amidos dependem também da estrutura molecular destas amiloses e amilopectinas que o compõem e da forma como são organizadas nos grânulos do amido. Estas relações entre a estrutura molecular e correspondentes propriedades funcionais, estão sendo objeto de vários estudos e pesquisas (FREDRIKSSON et al., 1997).

Compreender as propriedades funcionais dos amidos tais como temperaturas de gelatinização, reologia das pastas e retrogradação, é importante para o efetivo uso de amidos em composição de alimentos e outras aplicações industriais. Pesquisas indicam que a funcionalidade dos amidos depende em grande extensão da sua estrutura molecular, tamanho de cadeia e peso molecular da amilose e amilopectina (BILIADERIS, 1991).

Mua e Jackson (1997) realizaram pesquisas buscando verificar a relação entre atributos funcionais e a estrutura molecular de amiloses e amilopectinas de amido de milho e observaram que o conhecimento das características do peso molecular e estruturas ramificadas podem ser úteis na predição de muitas características funcionais em amidos de milho.

Quimicamente todos os amidos são iguais, compostos de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose unidos por ligações glicosídicas formando extensos polímeros, mas que apresentam características peculiares, intrínsecas às suas origens botânicas. Basicamente são compostos por dois tipos de macromoléculas: amilose, um polímero linear e amilopectina, um polímero altamente ramificado cuja estrutura molecular e proporção, afetam diretamente a funcionalidade do amido (BULÉON et al., 1998).

A amilose é considerada um polímero linear formado por unidades de D-glicose ligadas entre si por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e pode apresentar um pequeno número de ramificações. Seu grau de polimerização (GP) médio varia conforme a origem botânica do

amido, assim como a sua concentração percentual em relação às amilopectinas (BULÉON et al, 1998). Estes autores observaram que a variação também é afetada conforme a forma de extração e que os pesos moleculares das moléculas ramificadas são de 1,5 a 3 vezes maiores que aquele das frações lineares.

O peso molecular desse polímero é variável, podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose; em uma extremidade da cadeia polimérica a unidade terminal de glicose apresenta uma hidroxila e um grupamento aldeídico, sendo denominada extremidade redutora da molécula de amilose. A extremidade oposta da molécula apresenta uma unidade glicose denominada extremidade não redutora (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

Mua e Jackson (1997) verificaram que as amiloses derivadas de milho apresentavam peso molecular numa faixa de 1,03 a  $4,89 \times 10^5$  Da e grau de polimerização próximo a 1000 unidades ( monômeros ) de glicose.

A amilopectina é um polímero altamente ramificado, formado por unidade de D-glicose ligadas entre si por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e com 5 a 6% de ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificações e apresenta um grau de polimerização de cerca de  $10^4$  -  $10^5$  unidades glicose. Mua e Jackson (1997) verificaram que as amilopectinas derivadas de milho apresentavam peso molecular numa faixa de 7,08 a  $9,88 \times 10^7$  Da e grau de polimerização próximo a  $10^5$  unidades de glicose, com cadeias laterais variando de 15 a 18 unidades de glicose.

A molécula de amilopectina apresenta elevados pesos moleculares, com a maioria na faixa de  $10^8$  Da, sendo que a real distribuição de peso molecular permanece desconhecida já que as técnicas cromatográficas disponíveis são incapazes de fracionar este polímero com base no peso molecular (BULÉON et al., 1998).

O clássico método de separação do polissacarídeo amilose é por precipitação seletiva, utilizando-se a propriedade de sua complexação com 1-butanol e conseqüente separação por ultracentrifugação (WHISTLER, 1964). A aplicação deste mesmo procedimento repetidas vezes à fração de amilose precipitada, assegura uma razoável separação, obtendo-se então este polissacarídeo com baixo teor de contaminação por amilopectina e/ou outras dextrinas, porém com uma manipulação prolongada e exaustiva.

Por esse motivo principalmente, o método mais empregado para separar amilose e amilopectina é utilizando a cromatografia de permeação em gel (GPC). São empregadas colunas cromatográficas contendo gel específico para filtração, que separa componentes das amostras através de peneiras moleculares, baseando-se em seus tamanhos e configurações geométricas. Deste modo pode-se obter várias frações dos polissacarídeos de interesse para análises sobre suas características.

O gel é a fase estacionária na qual uma fase móvel líquida, geralmente água, ocupa os poros desta matriz apresenta tamanhos de partícula e poros homogêneos, química e fisicamente estáveis e sem propriedades de adsorção. O gel forma uma rede tridimensional com ligações cruzadas entre polímeros que podem ser dextrano, poliacrilamida ou agarose. Os géis são empacotados em colunas e as amostras contendo moléculas a serem separadas são colocadas no seu topo e arrastadas pelo eluente (COLLINS, 1990).

Collins et al. (1990) descrevem que as moléculas pequenas penetram pelo interior dos poros do gel e permeiam para a base da coluna, enquanto as moléculas maiores, não conseguindo penetrar no interior dos poros, contornam as partículas do gel e seguem mais rapidamente para a base da coluna, eluindo antes das moléculas menores. Sendo assim, as moléculas maiores eluem da coluna antes das moléculas menores. A separação de carboidratos utiliza água destilada ou algum eluente tampão como fase móvel e gel de dextrano, poliacrilamida ou agarose, como fase estacionária.

A literatura apresenta muitos trabalhos empregando GPC como um importante recurso para separar e purificar proteínas. Entretanto, nos poucos artigos publicados sobre separação de polissacarídeos e determinação de seus pesos moleculares, observa-se que há divergências entre alguns autores.

Cheetham e Tao (1997) realizaram estudos em 06 amostras de milho e verificaram que existe forte correlação entre o tamanho médio das cadeias de amilose com a concentração desta amilose no amido e que o tamanho das cadeias diminui conforme aumenta sua concentração. Os dados sugerem também que o tamanho médio das cadeias de amilopectinas irá aumentar com o correspondente aumento de amilose no amido e talvez isto explique porque amidos de milho com altos teores de amilopectina (*waxy*) tenham propriedades únicas.



Na maioria dos artigos publicados, observa-se que as principais fontes amiláceas são milho, trigo, arroz, batata, porém não há muitos estudos com amido de mandioca ou outras tuberosas amiláceas. Via de regra, buscam-se conhecer as estruturas moleculares dos amidos para identificar parâmetros que se correlacionem com suas propriedades funcionais de aplicações industriais. Sendo assim, as investigações se justificam, utilizando as metodologias disponíveis para compreensão destas estruturas moleculares em amidos da espécie *Manihot esculenta* Crantz com os ajustes adequados.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Grânulo de amido**

As características dos amidos dependem principalmente da planta onde foi produzido e estocado e, para efeitos de sistematização de estudos subdividiu-se em dois grupos; os originários de cereais e os de raízes. O armazenamento sob a forma de grânulos nas plantas e reaproveitamento da energia pela ação de enzimas é um mecanismo altamente favorável, pois durante a noite ocorre a utilização dos açúcares resultante de hidrólise para manutenção da planta (WHISTLER; DANIEL, 1993).

Nas células vegetais, os grânulos são formados dentro de estruturas especiais denominadas amiloplastos, envolvidos por uma matriz protéica denominada estroma. Ao microscópio óptico, o grânulo de amido mostra ser constituído de uma massa homogênea, mas por análise comparativa a outros, nota-se variações no formato, tamanho, simetria, etc. Quanto ao tamanho e a forma, estes são característicos da planta de origem e no geral os grânulos de amido possuem diâmetro que variam na faixa de 1 a 100  $\mu\text{m}$ , sendo que os originários de cereais têm menores diâmetros e maior concentração de proteínas e lipídios (GALLIARD; BOWLER, 1987).

A composição e estrutura do grânulo de amido já vêm sendo alvo de pesquisas há algumas décadas.

De acordo com Rickard et al. (1991) os amidos provenientes de mandioca apresentam grânulos redondos, ovais, poligonais e cilíndricos e foram observados diâmetros de 5 a 35  $\mu\text{m}$  com a média de 20  $\mu\text{m}$ . A densidade é também característica importante principalmente para os processos de extração, pois as velocidades de decantação são de valia para as separações e foram observados valores de 1,4857 g/mL para fécula de mandioca a 30°C (CIACCO; D'APPOLONIA, 1977).

Os grânulos de amido são compostos de camadas diversas que se superpõem ao redor de um ponto denominado hilo, que geralmente está no centro do grânulo. As camadas que circundam o hilo são resultantes da deposição de amido de diferentes graus de hidratação, resultantes da presença de amilose e amilopectina de modo que quanto maior a hidratação, mais escura é a camada e maiores diferenças aparecem em seus índices de refração (WHISTLER; BEMILLER, 1999).

De acordo com Linden e Lorient (1997) o grânulo do amido apresenta uma estrutura cristalina verificada pela presença de uma cruz de malta quando é observado sob luz polarizada. Apresenta também birrefringência, o que denota uma organização estrutural de orientação radial. O melhor método para investigação das estruturas cristalinas e regiões amorfas dos amidos é o de difração de raios-x.

De acordo com Zobel (1988) o grânulo nativo tem cristalinidade variando de 15 a 45%, indicando que este não é o principal modo de organização dos biopolímeros no grânulo. Em decorrência disso, o grânulo apresenta algumas zonas de estruturas rígidas e outras amorfas.

French (1984) supôs que os grânulos são compostos de camadas sucessivas de biopolímeros que se organizam de modo cristalino e intercalados com camadas amorfas. Estudos com difração de raios-X, identificaram padrões de organização dos tipos A (monoclínico), B (hexagonal), C (misto) e ainda uma configuração denominada V. Amidos de cereais e de algumas tuberosas tropicais, apresentam cristalinidade do tipo A, enquanto amido de batata e de algumas outras tuberosas tropicais são do tipo B. Sementes, legumes e outras tuberosas tropicais apresentam amidos com características de difração do tipo C.

A estrutura cristalina dos amidos produz padrões específicos de difração de raios-x, sendo classificados como dos tipos A, B ou C, sendo esta última

polimórfica resultante de misturas de A e B. O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas, sendo que as regiões onde concentra-se a amilopectina é mais densa ou cristalina. A organização dos grânulos ocorre com a deposição radial em torno de um ponto central denominado hilo e em sendo continuada, faz crescer a estrutura e dá origem ao grânulo semi-cristalino (FRENCH, 1984).

Atualmente é aceito que a amilopectina (que apresenta-se em torno de 75% na estrutura do amido) é predominantemente responsável pela cristalinidade do grânulo. As regiões cristalinas são localizadas nas camadas resistentes com espessura estimada entre 120 a 400 nm, que por sua vez são compostas de varias lamelas com forma de folhas. As lamelas cristalinas possuem espessura de 9 a 10 nm em média e não parecem estar em uma organização paralela. Supõem-se que as lamelas sejam constituídas e organizadas em duplas hélices de amilopectinas formando uma camada e são alternadas com mais camadas amorfas (GALLANT et al., 1997).

Gallant et al. (1997) em seus estudos com microscopia eletrônica de varredura, confirmaram a idéia de que as lamelas cristalinas e amorfas de amilopectinas são organizadas extensivamente em estrutura esféricas que são denominadas bloquetes. Os bloquetes possuem diâmetros em torno de 20 a 500 nm dependendo do tipo de amido e localização no grânulo. Na região semi-cristalina os bloquetes seriam menores (20 a 50 nm) indicando organização cristalina menor.

O tamanho do bloquete tem sido considerado um importante fator em amidos resistentes, embora outros fatores tais como conteúdo de amilose, localização e interação com amilopectina também possam estar envolvidos.

Gallant et al. (1992) indicaram que amidos resistentes tais como de batata e *amylomaize* possuem bloquetes mais largos (50 a 500 nm) do que amidos não resistentes.

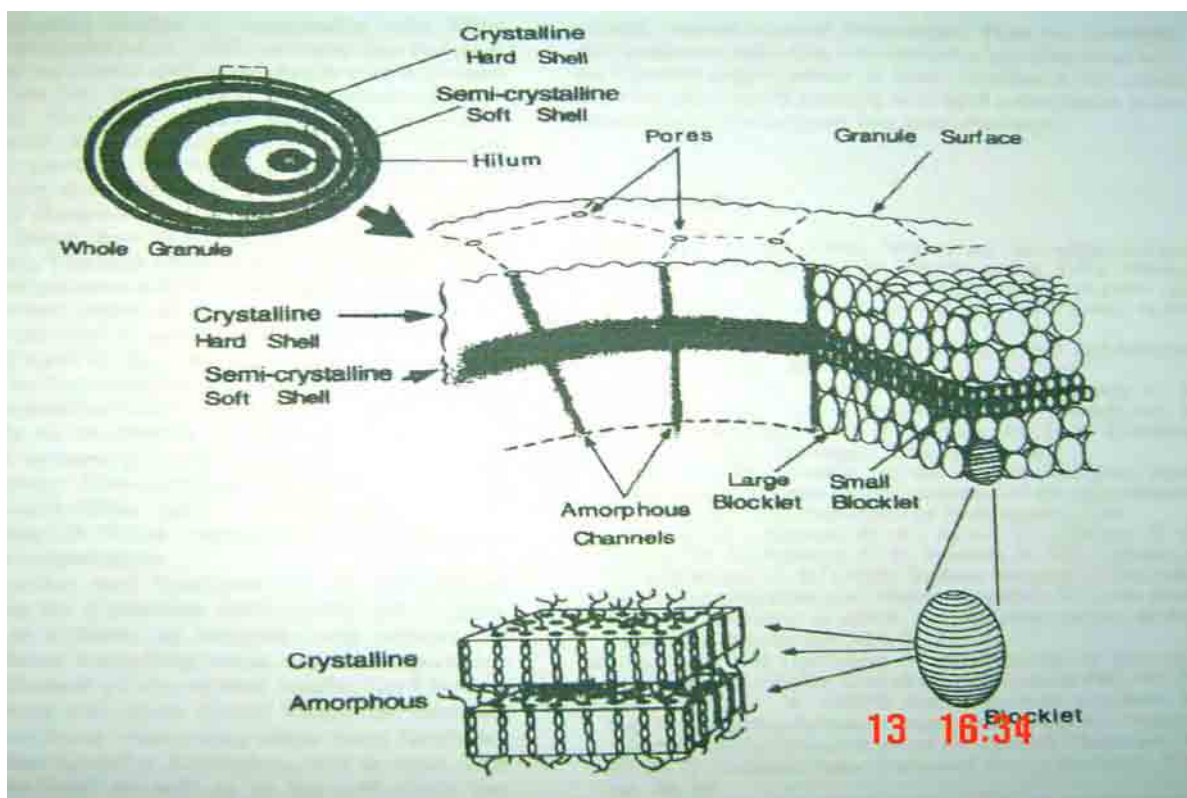


Figura 1 – Estrutura do grânulo de amido, segundo Gallant et al. (1997).

Já foram propostos alguns modelos para a organização estrutural das amilopectinas, mas ainda não está claro se ele se aplica a amilopectinas de diferentes fontes botânicas.

Jenkins et al. (1993) sugerem que as cadeias de amilopectinas dentro do grânulo estejam radialmente dispostas com o grupo não redutor em direção à superfície, e estas são organizadas em espaços de 9 nm alternando estruturas cristalinas e amorfas.

A amilopectina foi descrita por Whistler e BeMiller (1999) como uma macromolécula altamente ramificada, sintetizada a partir de uma única unidade de  $\alpha$ -D-glucopirranose ligada a uma molécula protéica iniciadora, a amiloginina. Outras unidades do monômero glicose são adicionadas seqüencialmente através da ação de enzimas responsáveis pelo aumento da cadeia e pelas ramificações.

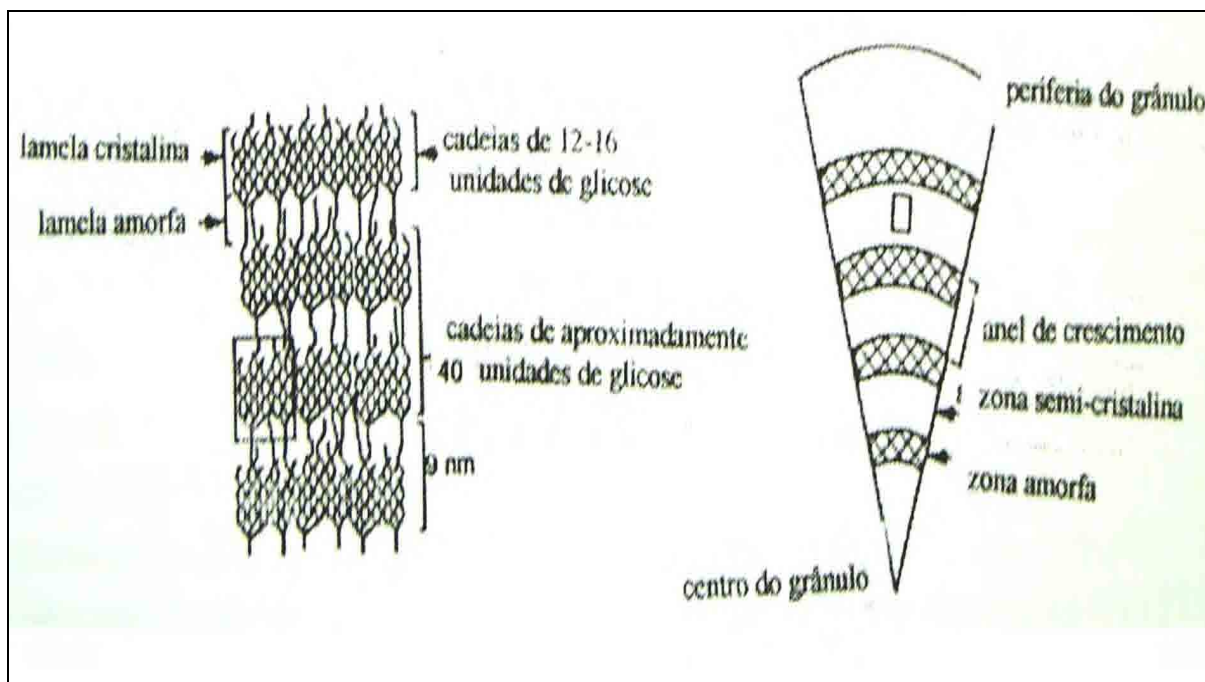


Figura 2 – Organização molecular das amilopectinas, segundo Smith et al. (1997).

## 2.2 Biopolímeros

A amilose é descrita como uma molécula essencialmente linear, sendo formada apenas por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, ou seja, o carbono nº 1 de um monômero glicose se liga ao carbono nº 4 de outro monômero. No entanto, alguns autores observaram um certo grau de ramificação em sua estrutura por meio de ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 (FRENCH, 1984; CURÁ, 1995).

A molécula de amilose se apresenta de forma helicoidal e em função desta formação de hélice, os filmes e fibras formados por ela são mais elásticos que aqueles formados por moléculas de celulose (WHISTLER; BEMILLER, 1964). O interior da hélice é lipofílico, contendo predominantemente pontes de hidrogênio, enquanto os grupos hidroxila permanecem na parte externa da mesma.

As amiloses apresentam conformação na forma de novelos interligados por pequenas extensões quando em soluções aquosas que se expandem quando se acrescenta álcali (WHISTLER; DANIEL, 1984).

Yu et al. (1996) verificaram que a complexação de amilose com moléculas de iodo é feita com cadeias poliodídricas mais longas tais como  $I^{3-}_9$ ,  $I^{3-}_{11}$ ,  $I^{3-}_{13}$  e  $I^{3-}_{15}$  e não observaram a participação direta de  $I_2$  no complexo.

Para a determinação de sua concentração em solução aquosa, o método de escolha tem sido o de colorimetria, medindo o complexo cromóforo formado pela capacidade da amilose formar um complexo na forma de hélice com aproximadamente 6 unidade de glicose que inclui um íon iodato (KNUTSON, 1999), que torna o método rápido, de baixo custo e apresenta uma razoável reprodutibilidade. Dentro da estrutura helicoidal da amilose é possível “acomodar” os íons iodato, formando um complexo de coloração azul intensa, cuja absorção máxima ocorre entre os comprimentos de onda de 600 a 650 nm, conforme os tamanhos das cadeias moleculares.

A grande maioria dos trabalhos que reporta o teor de amilose de amidos na realidade indica o teor de amilose aparente. A amilose estimada é denominada amilose aparente devido a ocorrência de amiloses de cadeias curtas que contribuem para teores subestimados de amilose, e amilopectinas de cadeias ramificadas externas mais longas que, por outro lado, resultam em teores superestimados (SHANNON; GARWOOD, 1984).

Jane et al. (1999) também relataram que cadeias ramificadas longas de amilopectina interagem com iodo, causando uma superestimação do teor de amilose quando este é determinado por titulação ou pelo método *blue value*.

Ácidos graxos livres e fosfolipídios formam complexo de inclusão com a amilose, podendo levar a resultados subestimados do teor de amilose. Morrison et al. (1993) observaram que os lipídios não estavam distribuídos uniformemente na fração amilose e provavelmente existiriam dois tipos de amilose: um complexado com lipídios (LAM) e outro livre de lipídios (FAM).

Os complexos de amilose com lipídios em sua grande maioria são insolúveis e amorfos (tipo I), mas ocorrem também formações semicristalinas (tipo II). Os complexos do tipo I, freqüentes na maioria dos cereais geralmente se dissociam sob aquecimento em água a 94-100°C (RAPHAELIDES; KARKALAS, 1988) enquanto os

últimos, que são encontrados em amidos após gelatinização, se dissociam entre 100 e 125°C (MORRISON, 1995).

Em um simples grão de amido com 20 µm de diâmetro, densidade de 1,5g/mL, teor de 25% de amilose com peso médio de  $5 \times 10^5$  Da, o número de cadeias poliméricas seria de  $1,8 \times 10^9$ .

Já a amilopectina, em presença de solução de iodo, produz um complexo de coloração avermelhada e estável em soluções aquosas diluídas. A interação dessas cadeias com o íon iodato resulta em absorção máxima na região entre 530 a 560 nm e esta estequiometria da interação iodo-polissacarídeo foi usada para o desenvolvimento de uma titulação potenciométrica ou amperométrica para estimar quantitativamente, amilose e amilopectina em amidos (GÉRARD et al., 2001).

Chen et al. (1997) observaram que os grânulos de amido podem ser facilmente dissolvidos em solvente dimetilsulfóxido (DMSO), sendo esta solubilização variável em relação à fonte botânica. Não ocorre degradação molecular conforme verificado por estudos viscosimétricos de amidos após terem sido solubilizados. Amidos de mandioca e araruta demoram para serem solubilizados em relação aos amidos de milho e sorgo e, estas solubilidades relativas são muito similares à susceptibilidade dos grânulos à hidrólise enzimática (LEACH; SCHOCH, 1962).

A elucidação da estrutura da amilopectina de amidos tem sido objeto de investigações e o modelo de *clusters* proposto por French (1984) tem sido o mais aceito, pois indica que uma molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C que carrega o grupo redutor da molécula e numerosas cadeias ramificadas denominadas A e B, conforme ilustra a Figura 3:



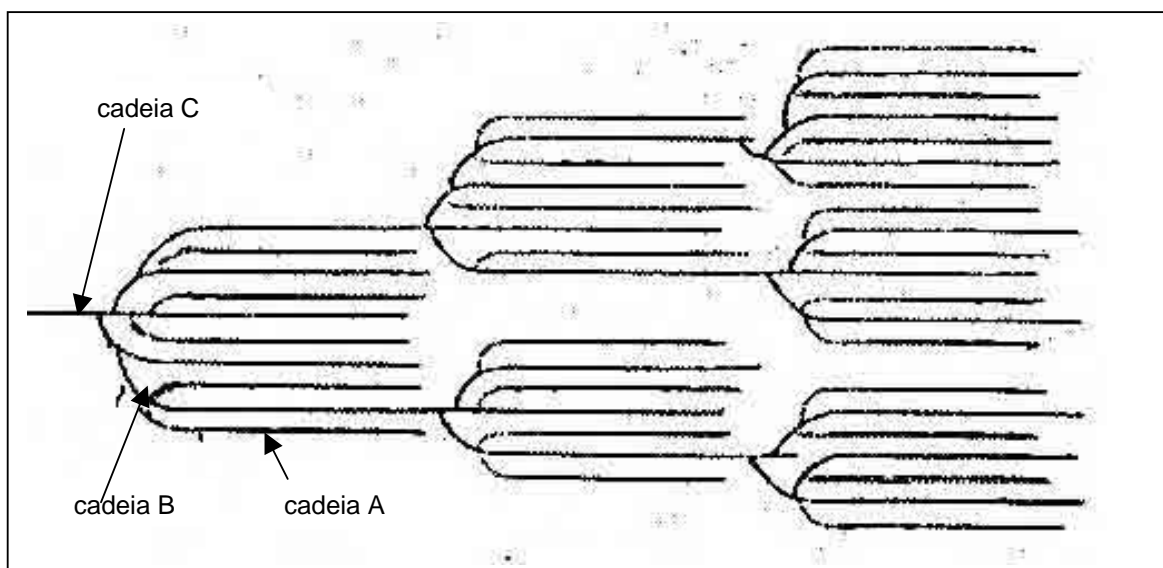


Figura 3 – Modelo de *cluster* proposto para amilopectinas (FRENCH, 1984).

As cadeias A são aquelas que são conectadas a outras cadeias por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, mas não possuem nenhuma ramificação. Cadeias B são aquelas conectadas a outras cadeias também por ligações tipo  $\alpha$ -1,6 e possuem uma ou mais cadeias do tipo A ou B ligadas a elas através de ligações  $\alpha$ -1,6. A relação entre as quantidades de cadeias tipo A e B é um importante parâmetro definido como grau de ramificação. Valores observados em experimentos mostraram-se na faixa de 0,8 a 2,2 em bases molares e 0,4 a 1,0 em base de pesos moleculares. Hizukuri (1985) verifica como sendo 0,8 a relação entre concentrações das cadeias A e B em amilopectinas de batata.

Utilizando-se enzimas amilolíticas desramificantes como isoamilases e pululanases, clivam-se as ligações  $\alpha$ -1,6 e pode-se observar três tipos de cadeias: a) cadeias curtas (S) constituídas de cadeias laterais do tipo A e cadeias internas do tipo B com grau de polimerização de 14 a 18 monômeros; b) cadeias longas (L) internas do tipo B com grau de polimerização de 45 a 55 monômeros; c) poucas cadeias muito longas com grau de polimerização acima de 60 monômeros. A razão L/S foi estimada em 5 para amilopectinas de padrão cristalino tipo B de amido de batata e em 8 a 10 para amilopectinas de padrão cristalino tipo A de amido de cereais (BULÉON et al., 1998).

Jane et al. (1999) investigaram 21 amidos de diferentes fontes botânicas e com diferentes padrões de cristalinidade e observaram que cada amido tinha um perfil diferente de distribuição de comprimento de cadeias ramificadas de amilopectinas. Amidos com padrão de cristalização tipo B apresentavam maiores proporções de cadeias longas que os de padrão tipo A ou C.

Semelhantemente à amilose, em um simples grão de amido com 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, densidade de 1,5 g/mL, teor de 75% de amilopectina com peso médio de  $5 \times 10^6$ , o número de cadeias poliméricas seria da ordem de  $5,4 \times 10^7$ .

O volume ocupado por uma molécula de amilose em solução pode ser representado pelo seu raio de giração, que depende do peso molecular seguindo uma relação  $R_i = M_i^n$ , onde  $R_i$  e  $M_i^n$  são respectivamente o raio e o peso molecular do componente  $i$  considerado, enquanto o expoente  $n$  é um tipo de coeficiente hidrodinâmico de Mark-Houwink. Roger et al. (1996) extraíram amilose de amido de milho a cada 5°C numa faixa de temperatura de 65 a 95°C e verificaram que o peso molecular depende do raio de giração da molécula. Verificaram que o coeficiente hidrodinâmico foi estimado na faixa de 0,6 a 0,7 e sugerem uma relação linear entre o raio de giração da macromolécula com o peso molecular para uma faixa de  $3 \times 10^5$  a  $9 \times 10^6$  g/mol.

Outros trabalhos foram realizados buscando relacionar o tamanho da amilose com o peso molecular em amidos de diferentes origens botânicas utilizando valores médios de peso molecular, mas estes valores têm apresentado discrepâncias devido provavelmente à: a) origem biológica do amido; b) degradações moleculares que ocorrem durante o fracionamento para obter-se a amilose.

Buléon et al. (1998) compilaram valores e os expuseram na Tabela 1.

Tabela 1 – Raio de giração e peso molecular médio de amilopectinas de milho e batata.

Fonte do amido	Raio de giração (nm)	Peso molecular médio x 10 <sup>6</sup>
Milho	105	10
	60	19,5
	229	22
	260	333
Batata	205	10
	160	195
	144	47

Fonte: Buléon et al. (1998)

A caracterização das soluções permeadas por Buléon et al. (1998) foi realizada por cromatografia de exclusão por tamanho acoplada a um detector a laser denominado *multi-angle laser light scattering* (SEC-MALLS). Ring et al. (1985) verificaram que o raio de giração de amilose estaria na faixa de 7 a 22 nm e Bello-Perez et al. (1996) verificaram para amilopectina valores de 21 a 75 nm. Esta diferença não pode ser utilizada como método de separação, mas sim como uma característica a ser considerada em conjunto com outras, nos estudos.

### 2.3 Cromatografia de permeação em gel

Cromatografia de permeação em gel (GPC), também conhecida como filtração em gel ou ainda cromatografia por exclusão de tamanho, é baseada no decréscimo da permeabilidade de uma rede tridimensional de um gel para filtrar moléculas de tamanhos diferentes. Se a solução contendo uma mistura de solutos de diferentes tamanhos moleculares for passada através de uma coluna carregada com um determinado gel, as moléculas pequenas penetram pelo interior dos poros do gel enquanto as maiores passam pela superfície exterior e como consequência as pequenas moléculas têm um maior tempo de residência na coluna. Deste modo o soluto é eluído em ordem decrescente de tamanho molecular havendo a separação das substâncias componentes da amostra (COLLINS et al., 1990).

Segundo Collins et al. (1990) numa coluna cromatográfica pode-se distinguir duas fases: uma estacionária, formada pelo gel e outra móvel, formada pelo solvente. O volume de solvente no interior do gel é conhecido como volume interno e definido como  $V_i$  e o volume de solvente na face externa do gel é designado por  $V_o$ . Na prática, determina-se o  $V_i$  através da fórmula:  $V_i = V_t - V_o$ , onde o termo  $V_t$  é o volume total do leito cromatográfico. O termo  $V_o$  é obtido após a permeação do padrão Blue Dextran 2000.

Um soluto colocado na coluna irá se distribuir nas duas fases numa extensão determinada por um coeficiente de distribuição  $K_d$  (também chamado de  $k_{av}$ ), que é constante e dependente da natureza do soluto, do solvente e também do gel, mas independente da geometria da coluna. O volume  $V_e$  é o volume de solvente requerido para eluição do soluto em máxima concentração da coluna e é igual à soma do volume externo do gel  $V_o$  e o volume no interior da fase estacionária  $V_i$ , ou seja:

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i \text{ e por decorrência, } K_d = (V_e - V_o) / V_i$$

O coeficiente  $K_d$  (ou  $k_{av}$ ) representa a fração da fase estacionária que é disponível à difusão de um dado soluto. Se a molécula do soluto é totalmente excluída do interior do gel por causa do seu tamanho então  $K_d = 0$  e neste caso o soluto passa pela coluna inteira na fase móvel e o volume de eluição  $V_e$  será igual a  $V_o$ . No caso inverso, tem-se  $K_d = 1$  e o volume de eluição será  $V_e = V_o + V_i$ . Entre estes dois extremos se distribuem as moléculas do soluto emergindo da coluna, separadas pelos diferentes volumes de eluição (AMERSHAM, 1998).

Conforme instruções da Amersham (1998), fornecedor do material para a permeação em gel, separações serão eficientes em colunas de gel para solutos contendo pequenas diferenças de tamanho das moléculas, quando realizadas em um gel com uma faixa de porosidade que abranja toda a faixa de tamanho das moléculas. Esta faixa é conhecida como a faixa de fracionamento do gel que convencionalmente é dado em termos de peso molecular.

Os fabricantes de gel para cromatografia oferecem seus produtos indicando as faixas de fracionamento e especificidade para os diferentes eluentes que podem ser utilizados nas separações. O eluente que emerge da coluna carrega consigo moléculas de diferentes tamanhos ao longo do tempo de permeação e volumes pré-determinados são automaticamente coletados em tubos de ensaio que são colocados sob a coluna para este fim.

O equipamento que realiza esta operação, denominado coletor de frações, permite que sejam trocados os tubos de ensaios a intervalos de tempo ou volumes pré-determinados, através de sensor automático. No entanto, fica evidente que devido à possibilidade de variações de fluxo (vazão) durante a permeação, a coleta programada por volume é a mais recomendada.

A determinação do peso molecular e conseqüente grau de polimerização foi objeto de estudos de vários autores sendo que o mais aceito é o método que correlaciona o  $V_e$  com o log da massa molecular de um padrão conhecido. É possível traçar uma função linear na maioria dos casos, que indicará a massa molecular e/ou grau de polimerização para um dado valor de  $V_e$  (AMERSHAM, 1998).

Cada tubo coletado que contiver uma fração do soluto (carboidrato) exige sua quantificação, realizada por metodologia analítica enzimática: cada fração é submetida à uma hidrólise enzimática com amiloglucosidase para transformação dos polissacarídeos em glicose, que desta maneira será quantificada geralmente por metodologia Somogy-Nelson para açúcares redutores. A metodologia consome uma quantidade de tempo muito superior à técnica de caracterização por cromatografia de alta resolução por exclusão de tamanho (HPSEC) aplicada às análises de carboidratos (FREDRIKSSON et al., 1997).

ZHEREBTSOV et al. (1995) descreveu o mecanismo de hidrólise ácida do amido em alta temperatura: após a fase de gelatinização do amido onde ocorre a liberação dos polissacarídeos amilose e amilopectina arranjados nos grânulos, inicia-se um processo de hidrólise das ligações tipo alfa-1,4 se o meio aquoso contiver hidrogênio ionizável disponível e temperatura elevada para superar a energia de ativação, em torno de 138,6 kJ/mol em pH 1,10. Estas rupturas das ligações ocorrem aleatoriamente produzindo dextrinas, oligossacarídeos e glicose que têm uma extremidade redutora, ou seja, uma carbonila com capacidade de fornecer elétrons numa reação de oxi-redução e esta propriedade é utilizada para quantificar a concentração de açúcares redutores totais numa solução ao reduzir cátions cúpricos, conforme reação do método Somogy-Nelson (SOMOBY, 1945).

Quando se efetua a determinação de açúcares redutores, está se quantificando também dextrinas e este efeito em pequena escala não tem afetado a intensa aplicação desta metodologia. É também possível caminhar em sentido contrário e determinar a concentração de amido a partir da concentração de açúcares redutores. Segundo Rickard e

Behn (1987) a conversão de amido a glicose atinge um máximo em torno de 94% em peso. Utilizaram um fator de conversão de 90% e baseando-se nestas informações, assumiu-se que “100,0 g de amido produzem 100,0 g de glicose”.

Ikawa et al. (1981) utilizaram a reação de complexação com iodato para caracterizar frações dos polissacarídeos de amido de milho, permeados numa coluna cromatográfica por exclusão de tamanho e as quantificaram através da concentração de açúcares redutores, após a sacarificação enzimática de cada uma delas. Num gráfico verificaram-se quatro regiões características de absorção molecular, que foram denominadas frações I, II, III e Intermediária, diferentes para cada variedade analisada.

Inouch et al. (1983) também aplicaram esta metodologia de caracterização num estudo comparativo sobre as concentrações relativas destes polissacarídeos em amostras de amido extraído de variedades mutantes de milho *waxy* (com alto teor de amilopectina) em três estágios de desenvolvimento das plantas e comprovaram que não ocorreram modificações na distribuição dos componentes nas diferentes fases do desenvolvimento da planta, mas a metodologia foi capaz de discriminá-los uns dos outros.

Hizukuri (1985) caracterizou amilopectinas de vinte amidos de diferentes espécies utilizando colunas cromatográficas de exclusão por tamanho e conjugado também a um fotômetro a laser (*laser-light-scattering photometer*) correlacionando as frações inferidas com os tamanhos de cadeias destes polissacarídeos, mas não especificou a capacidade de discriminar os diferentes tipos de polissacarídeos.

Fuwa et al. (1992) aplicaram esta mesma técnica em amostras de arroz. O amido após gelatinizado, sofria um processo de desramificação utilizando isoamilases, com o objetivo de diminuir o tamanho das cadeias e deste modo favorecer a filtração no gel cromatográfico. A enzima isoamilase EC 3.2.1.68, obtida de *Pseudomonas amyloclavata*, hidrolisa ligações tipo  $\alpha$ -1,6 das cadeias de polissacarídeos no meio e deste modo, indiretamente aumenta a concentração de polissacarídeos de cadeia linear, ou seja, as amiloses teriam um aumento em sua concentração de origem. A concentração e pureza da isoamilase, a temperatura e pH são fatores críticos para assegurar uma rápida e completa desramificação, pois contaminações com alguma  $\alpha$  ou  $\beta$ -amilase ou mesmo a presença de amilases nativas do amido produzem resultados incorretos.

Lloyd et al. (1996) utilizaram esta metodologia na caracterização das estruturas de amiloses e amilopectinas aplicando esta enzima na etapa de hidrólise dos amidos.

Não se observa na literatura considerações sobre a influência da utilização das enzimas nos resultados observados, o que nos levaria a crer que seria esta a única maneira de tratar amostras de amido para possibilitar sua permeação. Entretanto, outros autores contrariam esta conclusão ao fracionar amostras de amido com solventes como dimetilsulfóxido (DMSO) ou hidróxido de sódio (NaOH).

Taki et al. (1988) utilizaram a cromatografia em gel para extratos e resíduos amiláceos de milho e confirmaram também que ela é uma importante técnica para estimar a concentração de amilose obtida de amidos que apresentam concentrações elevadas de amilopectinas.

Kennedy et al. (1992) realizaram a dissolução de amostras de amido com hidróxido de sódio 1M e etanol, seguida de agitação enérgica num vortex até completar a dissolução. A solução era filtrada em membrana antes de ser utilizada.

Fredriksson et al. (1997) utilizaram maltoheptaose e algumas pululanas como referência para verificar o grau de polimerização das frações de hidrolisados permeados pela coluna.

Gérard et al. (2001) buscando determinar a concentração de amilose em amidos de várias fontes botânicas e de variedades mutantes de milho geneticamente modificados, realizaram a dissolução das amostras de amido por agitação durante 48 horas em dimetilsulfóxido (DMSO). A solução foi filtrada em membrana de 5 µm antes de ser aplicada na coluna para permeação utilizando solução a 0,02% de NaN<sub>3</sub> como eluente.

É possível observar nesses trabalhos citados, que os amidos apresentam características ligadas à suas origens botânicas. Como na literatura há poucas informações sobre as estruturas moleculares do amido de mandioca, isto mostra a necessidade da avaliação da técnica de cromatografia de permeação em gel e adaptação das metodologias de caracterização das frações permeadas para esta fonte botânica.

## 2.4 Características viscosográficas da pasta de amidos

Os grânulos de amido absorvem água e a sua estrutura sofre inchamento. Quando amidos são aquecidos em excesso de água, a estrutura cristalina se rompe e as moléculas de água ligam-se às hidroxilas das amiloses e amilopectinas através de pontes de hidrogênio, causando a ruptura e conseqüente solubilização do amido (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

O amido de batata tem alto poder de inchamento e solubilidade em relação ao amido de trigo, por exemplo e isto se deve a presença de grupos fosfato ligados covalentemente à amilopectinas (CRAIG et al., 1989). A presença de fosfato e fosfolipídeos contribui para alta viscosidade, alta transparência, capacidade de retenção de água e estabilidade a ciclo de congelamento. Os fosfolipídeos ligam-se às amiloses e com as cadeias maiores de amilopectinas formando complexos, o que resulta numa limitada capacidade de inchamento com água. Durante o inchamento do grânulo, ocorre exudação de amilose que se complexa com os lipídeos solúveis tornando-se então insolúveis. Estes complexos requerem temperaturas mais elevadas para se dissociarem (MORRISON et al., 1993).

Segundo Tester e Morrison (1990) as diferenças de comportamento de inchamento e solubilidade dependem do cultivar e da origem botânica do amido, pois estão diretamente relacionadas ao conteúdo de lipídeos, fósforo e organização do grânulo.

Uma solução de amido é uma mistura de grânulos inchados e grânulos fragmentados juntamente com dispersões coloidais e dextrinas originadas dos grânulos dissolvidos. Esta mistura de grânulos inchados e fragmentados depende da origem botânica do amido, conteúdo de água, temperatura e agitação durante o aquecimento (SINGH et al., 2003).

Quando uma suspensão aquosa de amido é aquecida acima de um certo limite, as ligações fracas das regiões amorfas se dissociam ocorrendo expansão tangencial e uma hidratação que continuamente aumenta formando uma estrutura contínua, cujas micelas são unidas. Os grânulos então apresentam um inchamento que é irreversível e sem qualquer organização estrutural. Continuando o inchamento, a amilose é lixiviada para a fase aquosa entre os grânulos, que propicia um aumento substancial da viscosidade (BILIADERIS, 1991).



A organização cristalina no grânulo de amido é característica básica que influencia suas propriedades funcionais, tais como poder de inchamento, perda da birrefringência, dissociação das duplas hélices das amilopectinas, solubilidade, dentre outras e sua desorganização é irreversível. Hoover (2001) menciona que esta transição de organização que ocorre quando se aquecem suspensões de amido tem sido investigada usando-se a técnica analítica DSC - calorimetria diferencial de varredura.

A gelatinização inicia-se no centro do grânulo (hilo central) e prossegue rapidamente para a periferia. Inicia-se primeiramente nas regiões amorfas do grânulo, pois as ligações de hidrogênio são mais fracas nestas regiões. As temperaturas de gelatinização e entalpias associadas com as endotermas de gelatinização variam em amidos de diferentes fontes e podem ser atribuídas a diferenças no grau de cristalinidade, ou seja, como se organizam os biopolímeros no grânulo (WHISTLER; BEMILLER, 1999).

De acordo com Whistler e Daniel (1993) a gelatinização e as propriedades de inchamento são controladas em parte pela estrutura molecular das amilopectinas (tamanho da cadeia, extensão das ramificações, peso molecular e dispersão), composição do amido (relação amilose/ amilopectina e conteúdo de fósforo) e arquitetura do grânulo.

A interação molecular provocada pelas pontes de hidrogênio que se formam após o resfriamento da pasta de amido gelatinizada, é chamada de retrogradação. Durante este fenômeno as amiloses formam associações na forma de duplas hélices com 40 a 70 unidades de glicose, enquanto amilopectinas apresentam cristalização pela associação de outras cadeias menores (JANE; ROBYT, 1984). Amidos retrogradados apresentam baixas entalpias de gelatinização em relação a amidos naturais porque eles têm pouca cristalinidade.

A variação nas propriedades térmicas dos amidos após gelatinização e durante estocagem a frio pode ser atribuída à variação na relação amilose / amilopectina, tamanho e formato dos grânulos e a presença ou ausência de lipídios. Grande concentração de amilose tem sido associada a uma elevada tendência a retrogradação de amidos, mas amilopectinas e materiais intermediários também afetam este fenômeno (SWINKELS, 1985).

Mestres (1996) observou que a perda da estrutura cristalina produzia inchamento dos grânulos e solubilização parcial dos biopolímeros resultando no aparecimento das propriedades viscoelásticas do amido. Estes fenômenos constituem as propriedades

funcionais e são consequência da perda da estrutura cristalina e que ocorrem após a gelatinização em um grande intervalo de temperatura.

Durante a gelatinização, o grânulo se rompe e simultaneamente amiloses são lixiviadas para o meio aquoso, de modo que uma pasta pode ser vista como um material composto de duas fases: i) uma dissolvente, contendo os polímeros dissolvidos, e outra, ii) dispersa, constituída de grânulos ainda inchados. Durante o desenvolvimento de um processo de gelatinização, sem agitação, tem-se uma fase contínua (o dissolvente), que se enriquece de amilose e uma fase dispersa de grânulos de amido inchados e enriquecidos de amilopectinas. Se ocorrer uma agitação muito forte durante a gelatinização, boa parte da amilopectina passa à solução. Destas duas maneiras de preparação fica evidente a diferença na composição molecular e consequentes diferenças nas propriedades reológicas (TESTER; MORRISON, 1990).

A estrutura cristalina apresenta imperfeições que afetam a solubilização dos grânulos de amido, ou seja, não existe uma temperatura para todos e sim uma faixa onde ocorre o fenômeno. Uma suspensão de amido pode receber aquecimento sem que ocorram transformações, a não ser um entumescimento dos grânulos. O amido de arroz, por exemplo, na temperatura de 60°C, absorve duas vezes o seu peso em água, que irá alojar nas camadas amorfas do grânulo pois dois terços do grânulo não estão arranjados de maneira cristalina, e prosseguindo, rompe-se liberando os biopolímeros. O poder de inchamento dos grânulos de amido de cereais é menor que aquele de amido de tuberosas (MOORE et al., 1984).

Os amidos exibem comportamento viscográfico único frente a mudança de temperatura, concentração da pasta e taxa de deformação aplicada. Isto pode ser medido através de aparelhos analíticos denominados viscoamilógrafos da empresa alemã Brabender, que é o mais tradicional. Atualmente o equipamento australiano RVA (*Rapid Visco Analyser*) por ser mais rápido, tem sido intensamente utilizado nos trabalhos.

A forma de uma curva produzida por um viscoamilógrafo é o reflexo do processo que ocorre durante o período de gelatinização de uma amostra do amido. A altura do pico para uma dada concentração reflete a característica do grânulo entumescer com absorção de água até o seu colapso. Os amidos que são capazes de entumescer muito,

apresentam baixa resistência de ruptura no aquecimento e também exibem uma viscosidade significativamente decrescente após atingir um valor máximo (SINGH et al., 2003).

Sarmiento (1997) verificou que a forma da curva do pico é de qualquer modo, fortemente influenciada pela concentração inicial de amido em suspensão na amostra. O aumento na viscosidade durante o período de resfriamento indica uma tendência dos vários constituintes presentes na pasta gelatinizada, tais como grânulos inchados, fragmentos de grânulos inchados, colóides e biopolímeros dispersos, de associarem-se ou retrogradarem enquanto a temperatura decresce.

Walker et al. (1988) desenvolveram uma metodologia utilizando um equipamento RVA, que foi posteriormente utilizada também por outros pesquisadores. Por exemplo, Zeng et al. (1997) a utilizaram com modificações no tempo para verificar variações nos fenômenos de gelatinização, empastamento e geleificação de amido de diferentes variedades de trigo.

Quando uma dispersão de amido é aquecida, os grânulos absorvem grande quantidade da água disponível e se incham. No início, a viscosidade aumenta rapidamente até atingir um valor máximo, sendo que em seguida, geralmente a viscosidade diminui bruscamente, devido à fragmentação dos grânulos. A variação da viscosidade da pasta enquanto esta é continuamente agitada a 95°C durante trinta minutos, indica a resistência dos grânulos inchados à ação mecânica (SARMENTO, 1997).

A Figura 4 mostra um exemplo de empastamento de amostra de amido utilizando o *Rapid Visco Analyser* (RVA) indicando os parâmetros: pico de gelatinização, empastamento, geleificação e retrogradação.

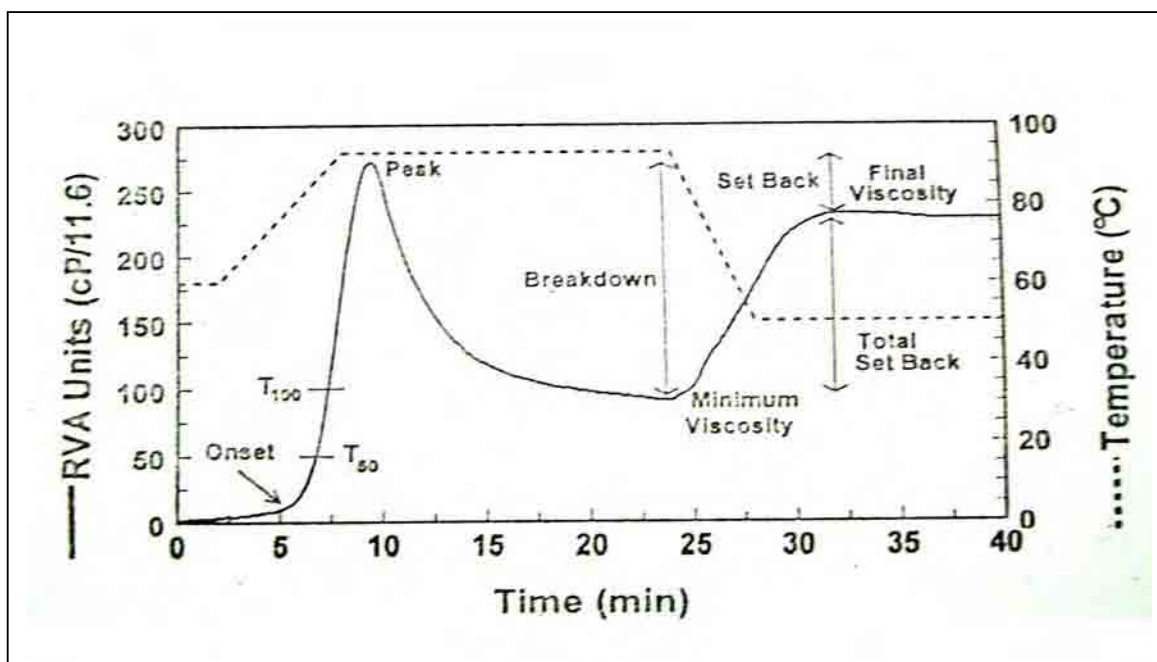


Figura 4 – Viscoamilograma típico de uma amostra de amido, obtido no RVA.

Fonte: Zeng et al (1997).

A linha tracejada no gráfico da Figura 4 mostra a evolução da temperatura, em °C com ordenada à direita, em função do tempo do ensaio. A linha cheia tem indicações de pontos que permitem obter informações sobre os parâmetros: i) onset – é a temperatura de empastamento ou ponto de inflexão, quando ocorre um forte aumento de viscosidade e determinado por uma mudança de 2 RVU num período de tempo de 4 segundos; ii) *Peak* – ponto de máxima viscosidade (minutos e RVU); iii) *Minimum viscosity* – menor valor de viscosidade (RVU) no período de manutenção da temperatura a 95°C; iv) *Final viscosity* – viscosidade final obtida após o resfriamento a 50°C (RVU); v) *Breakdown* – diferença entre o valor do *Peak* e o *Minimum* (RVU); vi) *Set Back* (retrogradação) - diferença entre o valor da viscosidade final e o *Peak* (RVU), e vii) *Total Set Back* – diferença entre o valor da viscosidade final e a *Minimum* (RVU) (MESTRES, 1996; THOMAS; ATWELL, 1999).

Estabelecer uma definição para cada um destes fenômenos é importante para a correta interpretação dos viscoamilogramas. Sendo assim, Mestres (1996) definiu:

- gelatinização: é o fenômeno da fusão dos amidos com a perda da sua estrutura cristalina e pode ser verificada pela: i) perda da cruz de birrefringência; ii) perda do espectro de difração de raios-X; iii) surgimento de uma endoterma de gelatinização.
- empastamento ou estado de pasta: é consequência da perda da estrutura cristalina que produz um inchamento dos grânulos com solubilização parcial dos biopolímeros e induz ao aparecimento de propriedades viscoelásticas. Ocorre depois da gelatinização do amido (fusão) num grande intervalo de tempo.
- geleificação: ocorre durante o resfriamento da pasta. O gel se opõe à uma solução por sua estrutura, sendo que a fase contínua é o polímero que forma uma rede tridimensional tendo em seu interior o solvente que se constitui na fase dispersa. É esta estrutura de rede que confere as propriedades viscoelásticas aos géis.

A taxa de incremento da viscosidade é calculada pelo tempo em minutos de sua mudança de 50 a 100 RVU. A unidade RVU representa uma viscosidade aparente e é igual à unidade cP/11,6 ( SARMENTO, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada nos laboratórios do CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais, localizado na Fazenda Experimental Lageado, Unesp, campus de Botucatu-SP.

As amostras de fécula foram fornecidas pelo CERAT, a partir de estoques excedentes originados de extrações de clones de mandiocas. As fontes originárias são 07 (sete) etno-variedades de mandioca de utilização industrial e para consumo *in natura* (de mesa), já devidamente caracterizadas e identificadas pelos códigos: A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7.

Uma melhor identificação das amostras está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação das amostras de féculas de mandioca.

Amostras	Nomes Vulgares	Origem	Aplicação
A1	Amarelinha	SP	Industrial ( farinhas )
A2	Vermelha	GO	Industrial ( farinhas )
A3	SRT – 1105 ( Mico )	SP	Consumo direto ( mesa )
A4	Mandioca 645	PA	Industrial ( farinhas )
A5	Orenina	PA	Industrial ( farinhas )
A6	Mantiqueira	SP	Industrial ( farinhas )
A7	IAC 576-70	SP	Industrial e de mesa

### **3.1 Concentração de amido nas féculas**

Silva e Cabello (2001) propuseram uma metodologia rápida e de alta reprodutibilidade e repetibilidade, para determinar o teor de carboidratos em uma amostra de fécula ou de um hidrolisado, cujas etapas estão descritas nos itens 3.1.1 e 3.1.2.

#### **3.1.1 Hidrólise das amostras de fécula**

Uma amostra de 5,00 g de fécula foi dispersa em 95,0 mL de água destilada num béquer com capacidade para 250 mL. Foi verificada a massa total do conjunto numa balança semi-analítica com duas casas decimais (resolução de 0,01 g) e em seguida o conjunto foi colocado num banho-maria sob agitação até atingir 90°C quando foi adicionado 1 mL de HCl 3M para que o pH ficasse em torno de 1,5.

Novamente foi pesado o conjunto e acrescentado o volume de água destilada de modo que a concentração de soluto fosse de 5% (m/m). O béquer retornou ao banho-maria na temperatura em ebulição justaposto um vidro de relógio em sua borda superior para evitar perda excessiva por evaporação e com bastão de vidro era efetuada agitação periódica a cada 2 minutos.

O tempo inicial foi considerado como sendo o de adição do HCl e a cada período de 20 minutos, o béquer era retirado, secado externamente e adequadamente colocado na balança, repondo a água evaporada de modo a recuperar o valor da massa contida no início daquele período de tempo.

Uma alíquota de 2 mL foi coletada por meio de uma pipeta volumétrica e diluída em água destilada num balão volumétrico de 50 mL. Registrou-se a massa do béquer e este foi retornado ao banho-maria. Manteve-se assim inalterada a concentração de soluto a 5%. Foram assim coletadas amostras nos tempos de 20, 40, 60, 80 e 100 minutos de hidrólise.

### **3.1.2 Determinação da concentração de Carbono Orgânico Total (TOC)**

Nas amostras diluídas obtidas nos diversos tempos de hidrólise foram realizadas determinações da concentração de carbono orgânico total utilizando um analisador de carbono com detecção por infravermelho marca Shimadzu, modelo TOC 5000A.

Cada amostra foi previamente filtrada em membrana de 1 µm para remoção de particulado insolúvel e foi tomado o valor médio de 03 (três) leituras consecutivas da concentração em ppm de carbono.

Através de um cálculo estequiométrico foi possível transformar os teores em ppm de carbono em mg/mL de carboidrato.

### **3.2 Preparo inicial das amostras**

As amostras de fécula foram inicialmente lavadas por três vezes com água deionizada e de pH neutro, para remoção de possíveis compostos solúveis contaminantes e em seguida foram secas em estufa a 40°C até atingirem umidade em torno de 10 a 15%.

Alíquotas de 20 gramas foram convenientemente tratadas por meio de sucessivas lavagens com etanol absoluto P.A. para remoção de matérias graxas e proteínas. Após este tratamento foram secas em estufa a 40°C para evaporar o excesso de etanol e por três vezes foram lavadas através da agitação em água deionizada, decantação do amido e retirada do sobrenadante, para remoção total do etanol remanescente.

Após a última drenagem, foram colocadas em estufa a 40°C durante 24 horas e em seguida, trituradas e levadas à secagem em estufa a 105°C para remoção da umidade residual, ficando armazenadas em frascos fechados até o início dos ensaios.

### **3.3 Dissolução das amostras para permeação**

Antes de iniciar a dissolução das amostras, estas foram secas em estufa a 105 ° C durante 15 h e em seguida, resfriadas em dessecador.



### **3.3.1. Ensaio com solução de dimetilsulfóxido (DMSO)**

Uma quantidade de 400 miligramas de cada amostra de fécula previamente seca foi dispersa em 20 mL de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 90% (v/v) e colocadas em um agitador com barra magnética à temperatura ambiente por 48 horas.

Após este tempo foi adicionada água deionizada para preparar uma solução final de fécula de 8 mg/mL.

Foram realizadas duas filtrações à vácuo desta solução, sendo a primeira em papel de filtro qualitativo, seguido de outra em membrana de 1  $\mu$ m, ficando disponibilizada para aplicação na coluna cromatográfica para permeação. As amostras injetadas na coluna tinham volume de 5 mL e concentração 8 mg/mL.

### **3.3.2 Ensaio com solução de hidróxido de sódio (NaOH)**

Uma quantidade de 250 miligramas de cada amostra de fécula previamente seca foi colocada num tubo de ensaio e em seguida recebeu 1,0 mL de etanol e uma alíquota de 15,0 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M. A seguir o tubo de ensaio foi colocado num vortex para agitação enérgica até completa dissolução (aproximadamente cinco minutos), após a qual foi adicionado um volume de 15,0 mL de água deionizada.

Foram realizadas duas filtrações a vácuo desta solução sendo a primeira em papel de filtro qualitativo, seguido de outra em membrana de 1  $\mu$ m, ficando disponibilizada para aplicação na coluna cromatográfica para permeação. As amostras injetadas na coluna tinham volume de 5 mL e concentração 8 mg/mL.

### 3.3.3 Ensaio com solução de hidróxido de sódio e enzima isoamilase

Foi seguida a metodologia proposta por Ikawa et al. (1981) descrita a seguir:

Foram pesadas 120 mg da amostra de fécula tratada e desidratada como descrito no item 3.2 e foram solubilizadas em 10 mL de solução de NaOH a 1M durante uma noite ( +/- 16 h ), em refrigeração entre 4 a 8 ° C. Após esse período, foi feita uma pré-neutralização das amostras com 1,4 mL de solução de HCl a 6M, seguida de agitação, conferindo-se o pH de cada amostra, com papel indicador universal de pH 0 a 14, e sempre foi necessário adicionar algumas gotas de solução de HCl mais diluída ( 0,1 M ) para deixar o pH na faixa entre 4 e 7.

Em seguida, adicionou-se 5 mL de uma solução – tampão acetato 30 mM com pH=3,5, sendo então adicionados às amostras, 500 µL da enzima isoamilase pré-diluída ( que continha 62500 UE ) , o que passou a corresponder a 3000 unidades da enzima.

O frasco com a enzima pura, da Sigma, continha 1.250.000 Unidades Enzimáticas, em 0,045 mL ( 45 µL ) de tampão sulfato de amônio a 2M. Essa quantidade de enzima foi diluída com o mesmo tipo de solução tampão para um total de 2,0000g em balança analítica. Após rigorosa homogeneização, foram pipetados 100 µL dessa solução de enzima e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Essa solução continha 62500 U.E. Como a literatura recomendava utilizar 1475 U.E para cada 60 mg de amostra, adotou-se pipetar através de pipetador automático, 500 µL da enzima previamente diluída.

As amostras foram incubadas a 40°C durante 22 a 24 horas e após esse período, o material foi concentrado à vácuo em rotavapor a aproximadamente 40° C e em seguida, novamente suspenso e dissolvido em solução de NaOH a 2 M até completar o volume de 10 mL.

As permeações foram realizadas em coluna de 70 cm x 2,6 cm, contendo o gel Sephadex G-75, utilizando como fase móvel uma solução de NaOH a 0,02 N misturada com 0,2 % de NaCl. Frações a cada 120 gotas permeadas ( 3,5 mL ) foram coletadas automaticamente através do coletor.

### 3.4 Preenchimento das colunas

As colunas fabricadas pela Amersham Pharmacia Biotech modelo XK 26/100 possuem diâmetro interno de 26 mm e comprimento total de 1 metro, sendo provida de dupla parede que permite a manutenção de temperatura controlada através de circulação de água termostaticada. As conexões do topo e da base são reguláveis, de modo que foi possível ajustar o comprimento desejado do leito cromatográfico.

Foram utilizados diferentes géis de enchimento que foram fornecidos já preparados para serem introduzidos nas colunas, exceto o gel Sephadex G-75, que foi fornecido na forma de pó seco, com instrução de preparo de modo a obter o volume desejado do leito cromatográfico.

Foi recomendado pelo fabricante que se pesasse a proporção de 1 g desse produto para cada 15 mL de gel que se desejasse obter, deixando em repouso a temperatura ambiente durante 24 h, em um becker com uma quantidade de água destilada maior do que o volume calculado de gel que deveria ser formado.

Após análise dos ensaios prévios, ajustou-se a coluna para ter altura de leito de 60 cm desse gel e temperatura estabilizada em  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , que foi obtida através da circulação de água originária de um banho de temperatura termostaticada com saída externa, da marca Lauda Brinkmann, modelo ecoline R-106. Para os demais géis empregados, as alturas dos leitos foram de 80 a 90 cm.

Na saída das colunas, o permeado foi conectado a um coletor de frações modelo Redfrac da Amersham Pharmacia Biotech contendo 175 tubos de ensaio de 10 mm de diâmetro e capacidade de aproximadamente 10 mL no carrossel. O sistema de mudança de tubo foi realizado em sincronismo com a bomba peristáltica modelo P-1 da Amersham Pharmacia Biotech que alimentava a coluna com a fase móvel adequada.

O enchimento de uma coluna para permeação em gel requer cuidados especiais, pois a ocorrência de descontinuidade do leito comprometem a qualidade e resolução da metodologia. Trincas e emendas não são admissíveis e para tanto o procedimento seguiu a metodologia proposta pelo fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, 1998).

Foram utilizados no enchimento das colunas um gel que apresenta estabilidade frente a substâncias ácidas e álcalis para exposições transitórias, mas que opera principalmente com fase móvel água. O volume das esferas do gel possuem tamanhos variados conforme o gel utilizado e foram utilizados os seguintes tipos de meios cromatográficos:

- Sephacryl S-500 que tem faixa de exclusão para dextrina estimada na faixa de  $4 \times 10^4$  a  $2 \times 10^7$  Daltons;
- Sephacryl S-1000 SF que tem faixa de exclusão para dextrina estimada na faixa de  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  Daltons;
- Sephadex G-75 que tem faixa de exclusão para dextrina estimada na faixa de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  Daltons;
- Sepharose CL-2B que tem faixa de exclusão para dextrinas estimada na faixa de  $7 \times 10^4$  a  $4 \times 10^7$  Daltons.

### **3.5 Permeação das amostras nas colunas cromatográficas**

Cada uma das amostras obtida conforme descrito no item 3.3 foi aplicada no injetor de amostras na quantidade de 5 mL e introduzida na coluna por arrastamento pela fase móvel correspondente, à taxa de 20 mL/hora. Os ajustes dos fluxos foram realizados a cada corrida, devido a uma pequena variação da pressão na bomba de alimentação quando acontecia a colmatação no gel nas colunas de permeação.

O coletor automático foi programado para coletar em cada tubo de ensaio, frações de 100 gotas que equivalem a 3 mL sendo que o início da coleta de frações para amostras preparadas foi: 2 horas após injeção das amostras dissolvidas em NaOH; 4 horas após injeção das amostras dissolvidas em DMSO; 1 hora após injeção das amostras dissolvidas em NaOH e tratadas com enzima isoamilase. Estes tempos foram estimados após testes preliminares, pois antes destes tempos nenhum soluto atingiu o final da coluna, fato comprovado pelos baixos valores medidos de carbono orgânico total.

Ao final da corrida cromatográfica, quando se atingia o último tubo, o coletor era desligado automaticamente, simultaneamente com o bombeamento da fase móvel.

Entre a permeação de uma amostra e outra, efetuava-se uma limpeza do gel da coluna, bombeando água destilada por pelo menos 24 h, a um fluxo de 35 a 40 mL/h.

Nas amostras permeadas nos géis Sephacryl S-500 e Sephacryl S-1000, a fase móvel utilizada foi água recém deionizada.

Nas amostras permeadas no gel Sepharose CL-2B e Sephadex G-75, a fase móvel utilizada foi solução aquosa de NaOH a 1mM e NaCl a 25 mM (SONG; JANE, 2000).

### 3.6 Curva de calibração dos tamanhos de moléculas

A metodologia de calibração é baseada na habilidade do meio de filtração cromatográfico em separar as moléculas de acordo com o tamanho. O peso molecular de amostras permeadas é determinado por comparação dos parâmetros de eluição ( $K_{av}$ ) da substância de interesse, com os valores obtidos por meio de conhecidos padrões de calibração (AMERSHAM, 1998).

Na prática, a curva de calibração foi preparada através da medida dos volumes de eluição dos seguintes padrões de proteínas e carboidrato, fornecidos em kits pela Amersham Pharmacia Biotech, conforme descritos nas Tabelas 3 e 4:

Tabela 3 – Informações sobre padrões de proteínas e carboidrato de alto peso molecular.

- Kit 17-0441-01 “High Molecular Weight”

Padrões	Peso molecular (Da)	Raio giração (Å)
Aldolase	158.000	48,1
Catalase	232.000	52,2
Ferritin	440.000	61,0
Thyroglobulin	669.000	85,0
Blue Dextran	2.000.000	-

Tabela 4 – Informações sobre padrões de proteínas de baixo peso molecular.

- Kit 17-0442-01 “Low Molecular Weight”

Padrões	Peso molecular (Da)	Raio giração (Å)
Ribonuclease	13.700	16,4
Chymotrypsinogen A	25.000	20,9
Ovalbumin	43.000	30,5
Albumin	67.000	35,5

Foram preparadas amostras com os padrões acima, na concentração de 5 mg/mL, exceto a Ferritin, que foi de 1mg/mL e o Blue Dextran, 8mg/mL.

Amostras de 5 mL dos diferentes padrões de proteínas foram injetadas aos pares na coluna cromatográfica contendo o gel Sepharose CL-2B, tendo como fase móvel solução a 25 mM de NaCl e 1 mM de NaOH.

A identificação da presença de proteínas nos tubos contendo os permeados foi realizada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro de absorção molecular com tecnologia “*diodo array*” (marca Varian modelo Cary Bio 50) na faixa entre 240 e 300 nm, sendo anotado o valor máximo de absorção. Utilizou-se cubeta de quartzo para que não houvesse interferência, pois as leituras foram realizadas na região ultravioleta do espectro. Com estes valores foi possível montar uma curva de calibração, tendo o logaritmo dos pesos moleculares como abscissa e o valor de  $K_{av}$  como ordenada.

A curva de calibração permitiu estimar o peso molecular a partir do  $K_{av}$  da fração coletada do permeado.

### **3.7 Análises para caracterização das frações coletadas**

Após a coleta de um número razoável de tubos/frações ( em torno de 70 a 90 tubos ), iniciou-se um teste prévio, que consistia em medir o teor de carbono orgânico total ( TOC ) de um a cada dez tubos coletados, para identificar a região do carrossel de coleta onde estavam as frações com os polissacarídeos permeados. Após encontrar a partir de qual tubo havia carboidratos, rastreava-se toda a faixa compreendida entre o primeiro e o último tubo contendo acima de 15 ppm de carbono orgânico.

#### **3.7.1 Concentração de carboidratos**

Em cada fração a ser analisada, foi estimada concentração de carboidratos indiretamente, através da determinação da concentração de carbono orgânico presente na alíquota coletada, conforme descrito por Silva e Cabello (2001). Essas medidas de carbono orgânico foram realizadas em um analisador de carbono da marca Shimadzu, modelo TOC5000A e com detecção na região do infravermelho específica para moléculas de CO<sub>2</sub>, que posteriormente eram convertidas às equivalentes concentrações de amido.

Esta técnica baseia-se na oxidação da matéria orgânica presente na amostra, da qual resulta na formação de CO<sub>2</sub>. A amostra é aspirada e arrastada até um forno de alumina aquecido a 680 ° C, onde todos os átomos de carbono são oxidados a CO<sub>2</sub>, o qual é detectado e quantificado no detector por infravermelho. Por comparação com a área formada na leitura dos vários pontos de uma curva padrão, o próprio software do equipamento transforma o sinal medido para ppm de carbono.

### **3.7.2 Afinidade ao reagente iodato**

Uma solução de iodo foi preparada, dissolvendo-se 0,0330 g de iodo em 0,1079 g de iodeto de potássio e elevando o volume a 1000 mL. Cada mililitro desta solução apresenta 0,033 mg de íon iodato. Alíquotas de 1 mL de cada fração foram misturadas em 3 mL desta solução de iodo, permaneceram em repouso por 5 minutos ao abrigo da luz e a seguir foram feitas as leituras no espectrofotômetro de varredura tipo *diodo array* que produziu curvas de absorção desde 400 até 700 nm. Os comprimentos de onda correspondentes ao pico máximo das curvas indicaram a região onde ocorreu a absorção máxima relativa às concentrações de amilose/amilopectina pela afinidade ao reagente iodato.

### **3.7.3 Concentração de açúcares redutores**

Essas análises foram realizadas seguindo metodologia proposta por Somogy (1945) e Nelson (1944). Por essa análise, consegue-se estimar o número de extremidades redutoras dos polissacarídeos permeados.

## **3.8 Concentração de amilose e amilopectina nas féculas**

Foi utilizada a metodologia ISO 6647 (ISO, 1987) para verificar a concentração de amiloses nas amostras de fécula de mandioca. O teor de amilopectinas na fécula foi calculado pela diferença que faltava para completar os 100%, uma vez que não existe metodologia direta para se determinar sua concentração em amidos.



### 3.9 Metodologia para análises viscográficas

As amostras de fécula, preparadas conforme o item 3.2, foram pesadas em torno de 2,5 gramas (calculadas exatamente para ter equivalência a um teor de umidade de 14 %), com os devidos ajustes para teores de umidade diferentes. Foi utilizado o aparelho *Rapid Visco Analyser* (RVA) série 4.0 da Newport Scientific e programa próprio “Thermocline for Windows”.

A célula de carga do aparelho RVA era carregada e adicionado com aproximados 25 mL de água destilada (também calculados exatamente para equivaler a 14 % de umidade). O aparelho foi ajustado para tratar amostras segundo metodologia denominada standard 2 da Newport e cujo método foi aprovado como ICC Standard Method nº 162.

A seqüência do método foi descrito por Leonel et al., (2002) e Peroni (2003):

- a amostra foi estabilizada numa temperatura de 50°C, recebendo agitação de 960 rpm por 10 segundos, após o que diminui para 160 rpm por um tempo de 50 segundos;
- durante um tempo de 7,5 minutos, à taxa de 6°C/minuto, foi realizado o aquecimento com a agitação até atingir 95°C;
- permaneceu por um período de 5 minutos, mantendo a temperatura constante de 95°C sob agitação;
- iniciou-se uma diminuição na temperatura por um período de 7,5 minutos, à uma taxa de 6°C/minuto até retornar a 50°C.
- finalização do processo, com emissão do relatório com os valores de: pico de viscosidade (RVU), *breakdown* (RVU), viscosidade final (RVU), *setback* (RVU), tempo do pico máximo (min) e temperatura de gelatinização (°C).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A montagem da coluna cromatográfica foi uma atividade que exigiu grande investimento de tempo, devido ao aparecimento freqüente de pequenos “defeitos” que eram representados principalmente por trincas no gel, o que demonstravam descontinuidade no leito filtrante e conseqüente prejuízo na permeação do soluto. Nestas técnicas de enchimento da coluna, um especialista da empresa fornecedora (Amersham Pharmacia) efetuou o treinamento adequado, mas a coluna após alguns dias de operação apresentava imperfeições que obrigavam a seu desempacotamento e posterior empacotamento com os devidos cuidados e conseqüentemente, um consumo de tempo considerável.

Após várias tentativas chegou-se a um procedimento que pareceu ser o mais razoável para evitar o entupimento da saída do adaptador da coluna. Sobre a malha de *nylon* que retém o gel dentro da coluna, foi adaptada uma folha de papel de filtro com microfibras de vidro, de modo que o gel não tocasse diretamente essa tela de *nylon* denominada “net ring”. Com esse recurso, foi possível permear cerca do triplo de amostras do que se permearia sem essa adaptação.

#### 4.1 Ensaios de permeação em gel

Para se determinar um dos parâmetros da coluna, qual seja, o volume  $V_o$ , utilizou-se a aplicação de um soluto cujo peso molecular era superior ao limite máximo de exclusão, ou seja, todas as moléculas do soluto percorreriam a face externa do gel devido ao seu tamanho não ser capaz de penetrar os poros e deste modo, quando estas moléculas completassem o percurso e fossem detectadas na saída da coluna, o volume de eluição seria determinado como sendo o volume  $V_o$ .

Isto foi tentado inúmeras vezes, mas não foi possível efetuar esta medida, pois a substância Blue Dextran, indicada pelo fabricante e utilizada extensamente em pesquisas, possui peso molecular de  $2 \times 10^6$  e portanto, dentro da faixa de inclusão do gel Sephacryl S-500, inicialmente selecionado para as permeações.

Nos pré-ensaios foi verificado que a vazão inicialmente especificada de 120 mL/hora estava muito elevada e ocasionava a colmatação do leito cromatográfico após duas corridas de amostras, sendo necessário então desmontar a coluna, tratar o gel com solução de tetraborato de sódio a 0,1 M, lavar com água destilada para remover o tetraborato e novamente preencher a coluna cromatográfica com o gel.

Este problema de operação das colunas evidentemente não era esperado e novamente o fabricante foi contatado, o qual sugeriu a utilização de uma vazão menor, formulando a hipótese da existência de macromoléculas que provavelmente não tinham tempo para “deslizar” pelos poros.

Diminuiu-se então para vazão de 40 mL/hora e deste modo verificou-se uma sensível melhora, uma vez que a coluna permitia até quatro permeações sem apresentar tal obstrução.

Poucos dias depois, uma nova sugestão enviada pelo fabricante indicava a aplicação de 100 mL de solução de hidróxido de sódio a 0,5 M por 2 horas e a seguir, um fluxo reverso aplicando de 3 a 5 volumes de coluna de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e mais lavagem com água deionizada no sentido do fluxo normal. Efetuando-se esta operação a cada quatro corridas não haveria a necessidade de desmontagem e remontagem da coluna. Estas operações de lavagem consumiriam um tempo de aproximadamente 60 horas e poderiam ser realizadas nos finais de semana.

Na prática, não foi possível realizar esses procedimentos de limpeza, pois o entupimento era de tal forma que não havia meios de fazer a solução alcalina ser arrastada para dentro da coluna com o gel. Mesmo que após muita insistência isso fosse conseguido, seria praticamente impossível lavar o gel de dentro da coluna passando mais de 1500 mL de solução de NaCl a 0,85 %.

Principalmente nos primeiros meses da pesquisa foi realmente necessário desmontar a coluna, retirar todo o gel, lavar abundantemente com água destilada e reempacotar novamente a coluna com o gel, além de padronizar a intensidade de compactação do gel.

Solucionadas essas dificuldades iniciais, cada amostra de amido preparada foi adequadamente aplicada à coluna cromatográfica e a coleta das frações foi ajustada para permitir a caracterização das amiloses e amilopectinas permeadas.

Considerando que em cada permeação foram gerados inúmeros resultados, tanto nas medidas do TOC, quanto nas reações dos polissacarídeos permeados com o reagente iodato ou até mesmo as medidas dos teores de açúcares redutores, estes foram condensados e estão expressos nos gráficos a seguir:

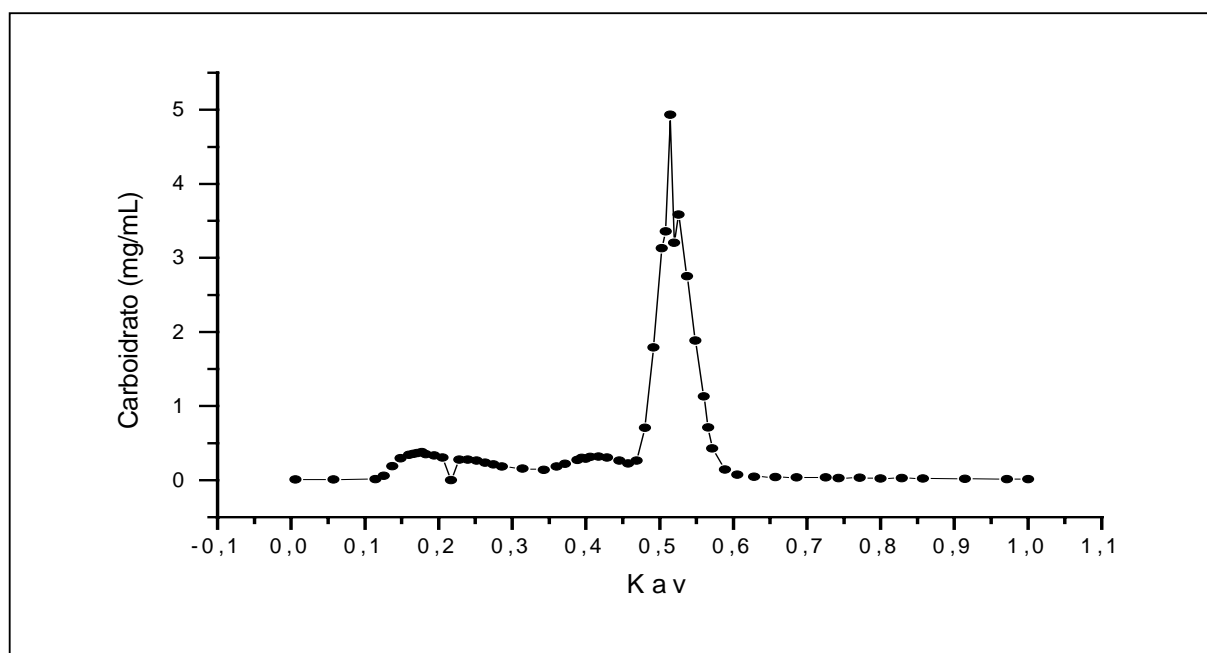


Figura 5 – Perfil de eluição da amostra A3 dissolvida em NaOH.

Analisando-se o gráfico da Figura 5, verificou-se que quando o valor de  $K_{av}$  está na faixa de 0,45 a 0,6 ocorre a eluição da maioria dos carboidratos injetados na coluna, indicando que provavelmente seriam as moléculas de amilose e amilopectinas que apresentaram um semelhante raio de giração quando em solução. As amilopectinas provavelmente estariam sendo eluídas primeiramente, devido aos seus maiores raios hidrodinâmicos, em  $K_{av}$  0,1 a 0,45, com picos em 0,15 e 0,4.

Segundo Ring et al. (1985) o raio de giração das amilopectinas estariam em torno de 21 a 79 nm e em comparação com o das amiloses, que situa-se na faixa de 7 a 22 nm, esperava-se que as amilopectinas fossem eluídas primeiro do que as amiloses. Mas na região de  $K_{av}$  0,45 a 0,6 não estariam somente as amiloses, pois as análises efetuadas na matéria prima de origem indicaram concentração de amilose em torno de 18,8% e a área é superior a 50% do cromatograma, indicando portanto a ocorrência de uma separação deficiente.

Na Figura 6 o perfil refere-se ao material de mesma etnovariedade botânica, mas o amido foi dissolvido utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO), conforme descrito no item 3.2.1.

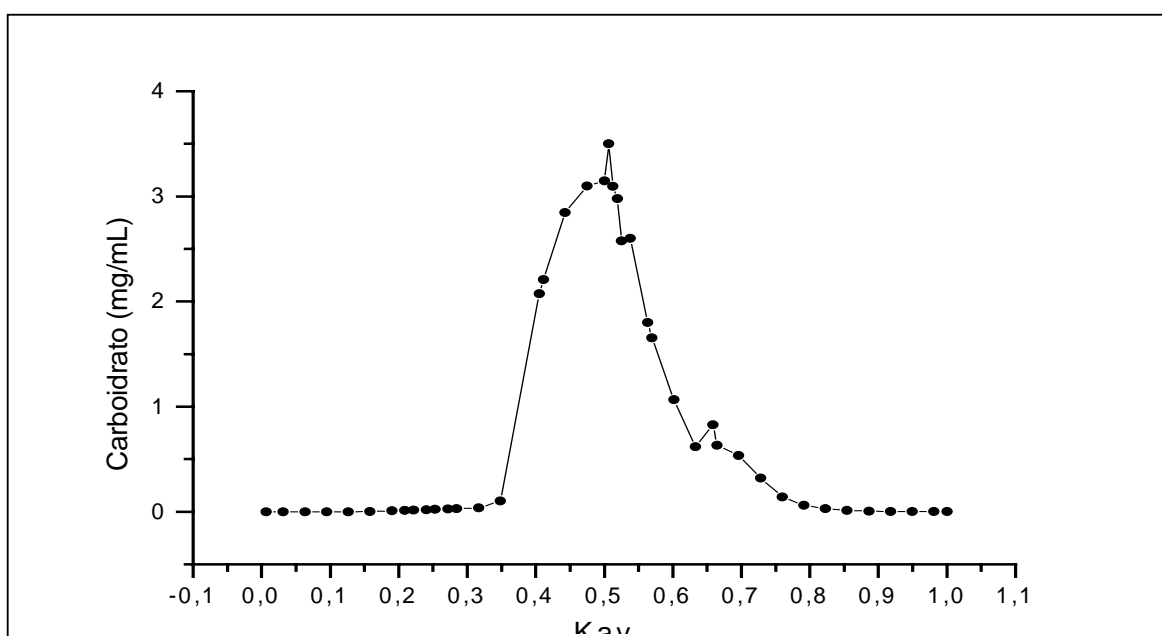


Figura 6 – Perfil de eluição da amostra A3 dissolvida em DMSO (Dimetilsulfóxido).

Os resultados obtidos com a metodologia para quantificação de carboidratos utilizando a hidrólise enzimática e posterior determinação dos açúcares redutores pelo método Somogy-Nelson, conforme especifica o item 3.7.3, não apresentaram resultados coerentes, provavelmente devido à interações entre os reagentes.

Para a elaboração do gráfico da Figura 6, os dados foram linearmente ajustados com a aplicação de um coeficiente para efetuar a compensação pela utilização do método de determinação da concentração de carboidratos com o TOC conforme especifica o item 3.7.1.

Objetivando efetuar uma análise comparativa das duas metodologias de preparo das amostras, ajustou-se um coeficiente de correção considerando-se que a mesma massa de carboidrato foi injetada nas duas permeações, então elas deveriam ser eluídas proporcionalmente às concentrações de carbono das moléculas dos biopolímeros separados. No entanto, os teores de carbono nas frações permeadas com o solvente DMSO foram consideravelmente maiores, devido à existência de átomos de carbono no solvente. Assim, aos valores de concentração de carboidratos da amostra A3 dissolvida em DMSO e medidos pelo TOC, eliminou-se a contaminação do carbono existente no solvente.

A separação neste caso foi mais deficiente do que a observada na amostra A3 em NaOH, indicando que os parâmetros utilizados ainda não estão devidamente ajustados.

Gérard et al. (2001) utilizaram um sistema de cromatografia com altura de leito de 200 cm e vazão de 10 mL/h ou seja, o leito foi o triplo e a vazão a quarta parte dos parâmetros utilizados neste trabalho e mesmo assim a separação não atingiu a resolução daquela observada em outros trabalhos que utilizam a desramificação das amilopectinas de modo a facilitar a permeação.

Hizukuri (1985) e Fuwa et al. (1992) utilizaram esta metodologia e analisando o perfil da eluição, conseguiram boa resolução na separação.

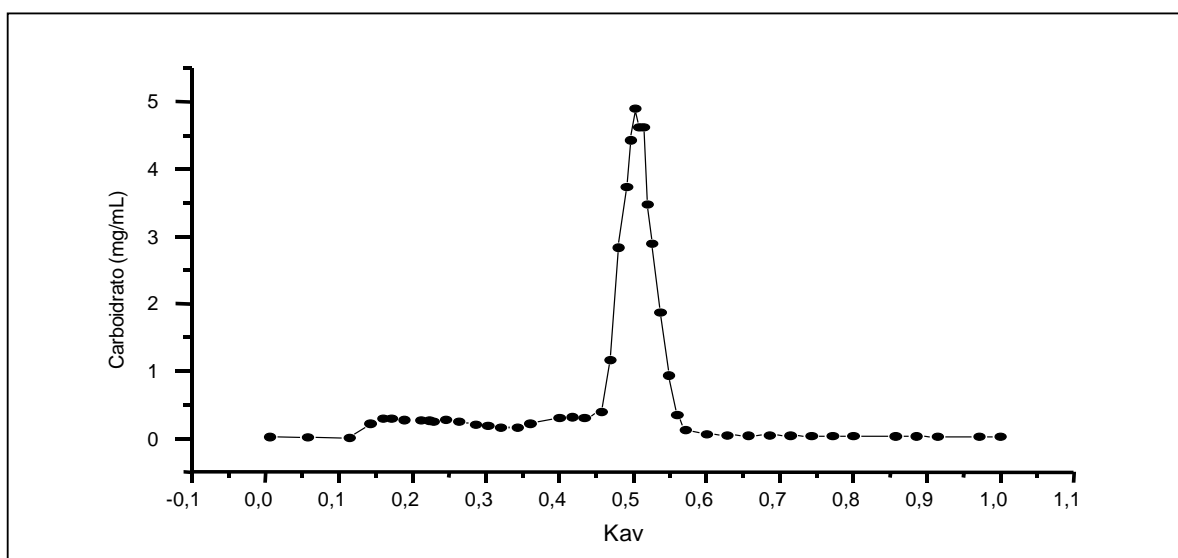


Figura 7 – Perfil de eluição da amostra A4 dissolvido em NaOH.

O gráfico da Figura 7 é semelhante ao da Figura 5, onde observou-se a ocorrência da provável permeação das amilopectinas de maior raio de giração (conseqüentemente, maior peso molecular) no intervalo de Kav de 0,1 a 0,45 com picos também em 0,15 e 0,4. Semelhança observada também no perfil de eluição no intervalo Kav de 0,45 a 0,6.

Como as amostras injetadas possuem a mesma concentração e volume, as concentrações nos picos também são semelhantes, pois possuem a mesma altura. A mesma consideração pode ser feita com relação ao poder de separação deficiente apresentado pela amostra A3 em NaOH, indicando a deficiência no poder de resolução da metodologia.

Semelhantemente, o gráfico da Figura 8 também apresenta um perfil idêntico ao das Figuras 6 e 7 com os mesmos picos característicos, mostrando uma boa reprodutibilidade e indicando que a metodologia está ajustada exceto quanto à resolução.

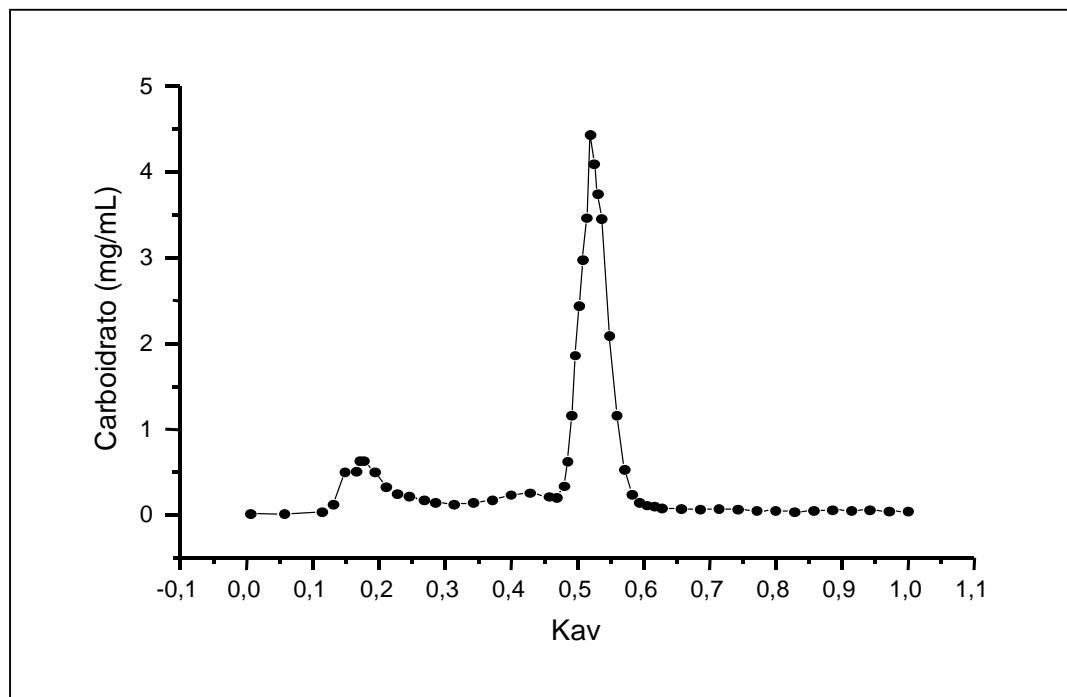


Figura 8 – Perfil de eluição da amostra A6 dissolvida em NaOH.

As amostras apresentaram diferentes concentrações de amilose e não foi possível verificar estas diferenças pelo gráfico, devido à deficiente separação dos polissacarídeos e a título também de ajustes da metodologia, foi realizado um ensaio com as frações coletadas da permeação da amostra A4 (em NaOH) com o reagente iodato, conforme item 3.7.2 .

O perfil obtido está disposto na Figura 9, mas não indicou preponderância de um dos polissacarídeos em relação a outro nas várias frações coletadas. Este gráfico mostrou que a separação não foi eficiente, pois os valores de absorção máxima correspondentes às amiloses e às amilopectinas estão muito próximos, para um mesmo valor de Kav. No entanto, deveriam ter variado conforme o tamanho das cadeias poliméricas (CHEETHAM; TAO, 1997). Em uma faixa de Kav entre 0,1 e 0,2 deveria haver somente moléculas grandes de amilopectinas, cuja absorção máxima ocorre em 540 nm, enquanto que na faixa de Kav entre 0,3 e 0,5 deveria haver somente moléculas de amiloses, cuja absorção máxima ocorre acima de 600 nm, fato não observado.



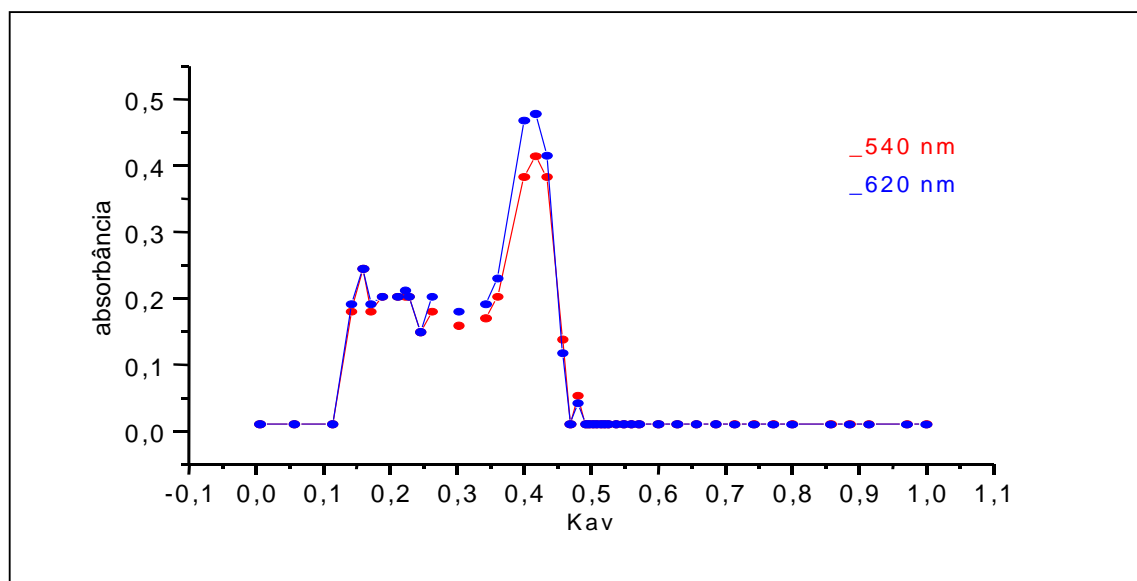


Figura 9 – Perfil de eluição com as frações da amostra A4 dissolvidas em NaOH e complexadas com o reagente iodato, medidos a 540 e 620 nm.

Gérard et al. (2001) correlacionaram os valores de absorção máxima de cada fração de carboidrato coletada e complexada com iodo, de modo que num perfil de eluição foi possível ver as transições dos tipos de biopolímeros que estavam sendo eluídos.

A Tabela 5 apresenta um resumo dos resultados experimentais obtidos nos ensaios preliminares para as permeações no gel Sephacryl S-500.

Tabela 5 – Principais resultados experimentais obtidos nos ensaios preliminares de permeação das amostras no gel Sephacryl S-500.

Variáveis /	Amostras:	A3 (NaOH)	A3 (DMSO)	A4 (NaOH)	A6 (NaOH)
Volume soluto c/ concentração	8 mg/mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Limite exclusão do gel			$4 \times 10^4$	a	$2 \times 10^7$
Altura do leito filtrante		83 cm	89 cm	83 cm	83 cm
Temperatura da coluna		25°C	25°C	25°C	25°C
Fase móvel solvente		água deion.	água deion	água deion	água deion
Tempo até início coleta frações		2 horas	4 horas	2 horas	2 horas
Quantidade de frações de 3 mL coletadas		175	175	175	175
Vazão fase móvel		40 mL/h	40 mL/h	40 mL/h	40 mL/h

Nos primeiros ensaios de permeação foi verificado que o gel Sephacryl S-500 não realizou uma separação eficiente das amostras de amido que eram aplicadas na coluna, sendo que os perfis de eluição não foram capazes de separar e distinguir os diferentes tipos e tamanhos das cadeias de amiloses e amilopectinas.

A proposta de diminuir a vazão da fase móvel para 20 mL/h mostrou-se conveniente, mas a melhora na resolução não foi significativa, conforme pode-se verificar no gráfico da Figura 10, onde observa-se um perfil de eluição de amostra de fécula A6. A fração contendo amilopectinas de maior peso molecular e maior raio de giração deveria apresentar um pico mais característico com valor de  $K_{av}$  em torno de 0,1.

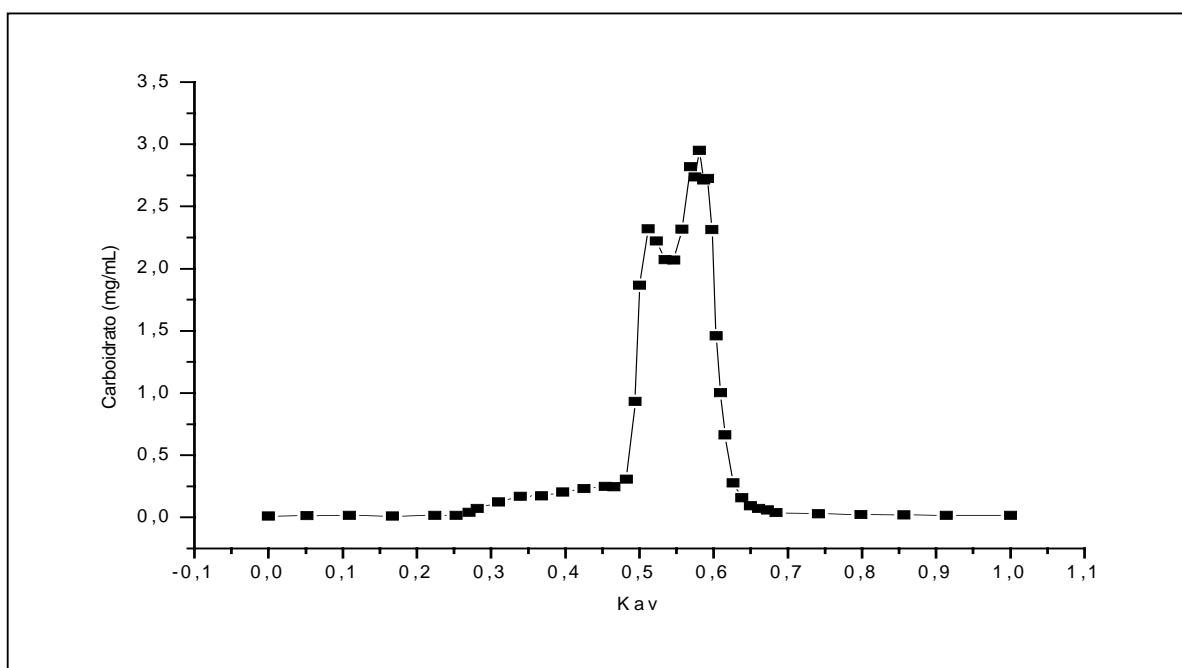


Figura 10 – Perfil de eluição da amostra A6 em gel Sephacryl S-500, com fluxo da fase móvel em 20 mL/h.

Outra característica que sempre esteve presente foi a permeação imperfeita do Blue Dextran, pois este deixava a coluna com manchas azuladas caracterizando sua acumulação residual na fase fixa da coluna, que obrigava a longas operações de remoção com tetraborato de sódio a 0,1M seguido de lavagem com água destilada.

Buscando melhorar a resolução da separação, foi testado um gel com uma maior faixa de exclusão, ou seja, o Sephacryl S-1000 que segundo informações do fabricante, teria teoricamente uma maior capacidade de desagregar os diferentes tipos e tamanhos de moléculas que estivessem saindo agrupadas.

Os parâmetros de operação foram os mesmos que os anteriores e no gráfico da Figura 11 pode-se observar o perfil de eluição.

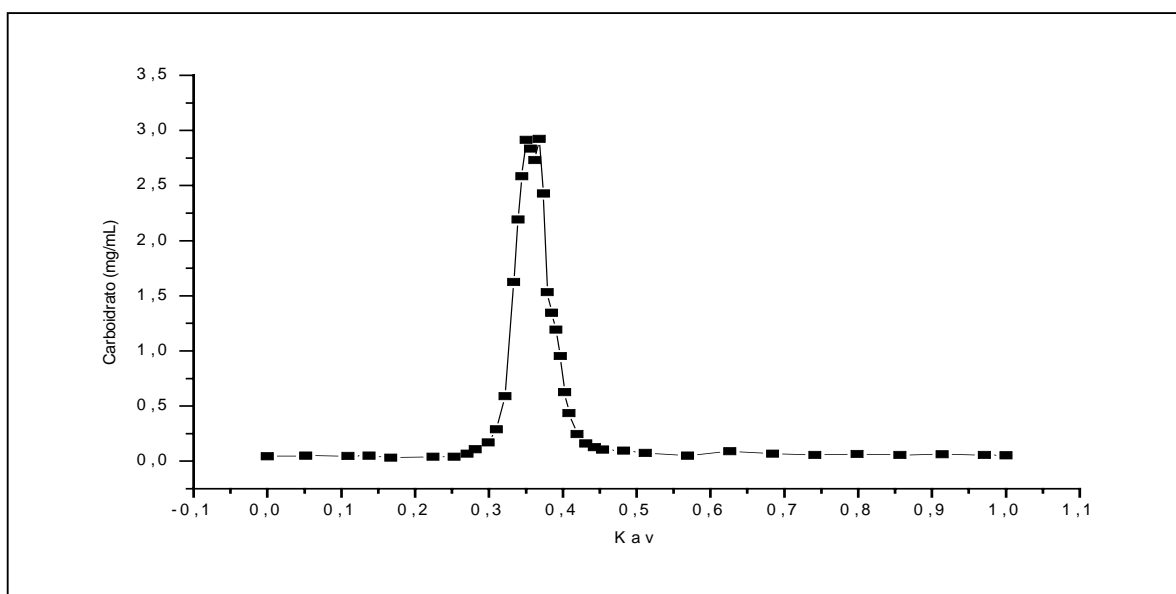


Figura 11 – Perfil de eluição da amostra A6 em Sephacryl S-1000 com fluxo da fase móvel em 20 mL/h.

Como se pode observar, não houve aumento da resolução, mas uma pequena “compactação” de amilopectinas e amiloses que permearam juntas no Kav de 0,35 a 0,45. Este gel não deu a resposta com a resolução esperada e então buscou-se um outro meio cromatográfico.

Com apoio na literatura, verificou-se trabalhos publicados por Song e Jane (2000) e Lloyd et al. (1996) que utilizaram Sepharose CL-2B (Amersham Bioscience) com fase móvel 0,01 M NaOH e fluxo de 30 mL/h. Este gel é de utilização em aplicações industriais e o fornecedor concordou em fornecer pequena quantidade (1,0 kg) para as pesquisas. Uma coluna foi então convenientemente carregada com este gel, seguindo os

procedimentos indicados pelo fabricante, e conseguiu-se uma melhor separação após numerosos ensaios. O método que apresentou melhores resultados foi o proposto por Song e Jane (2000), cuja permeação foi realizada sob fluxo ascendente da fase móvel na coluna.

O parâmetro cromatográfico  $V_0$ , foi determinado com o padrão Blue Dextran 2000 conforme metodologia exposta pelo fabricante Amersham Pharmacia Biotech (1998), cujo resultado foi igual a 104,6 mL. Este valor foi tomado para os cálculos do  $K_{av}$  de todas as amostras permeadas.

As sete amostras de fécula foram permeadas e os resultados da caracterização de suas frações estão expressos nos gráficos das Figuras 12 a 18, onde aparecem os perfis de concentração de carboidrato e também de comprimentos de onda de maior absorbância da reação com o iodato.

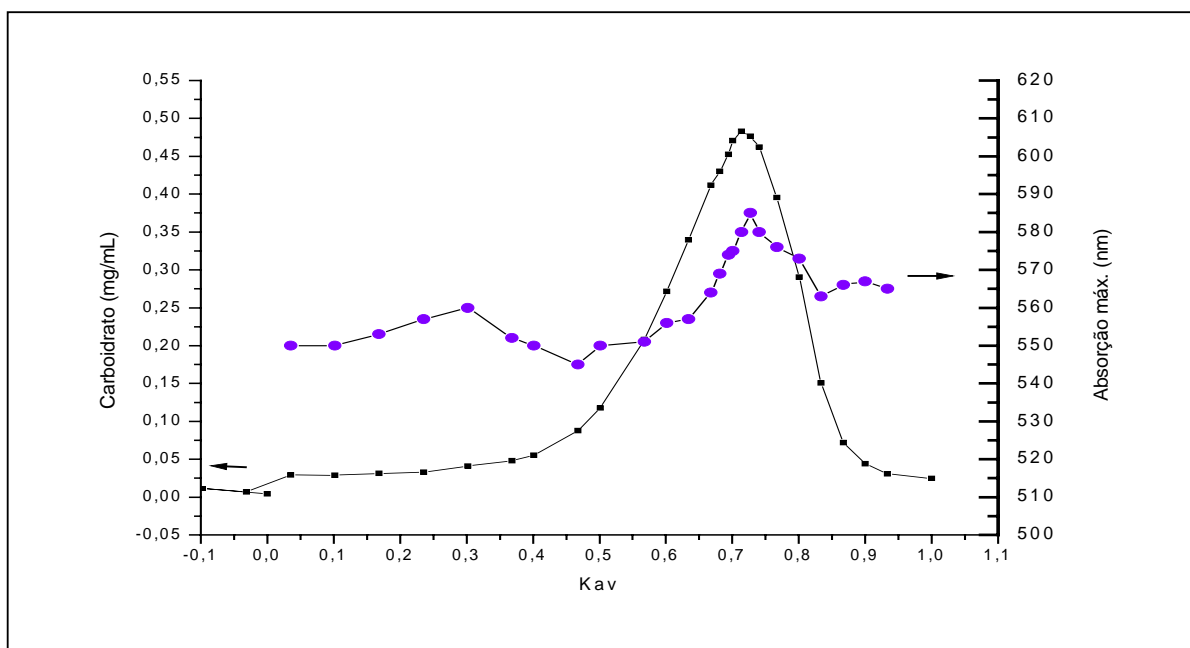


Figura 12 – Perfil de eluição da amostra A1 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

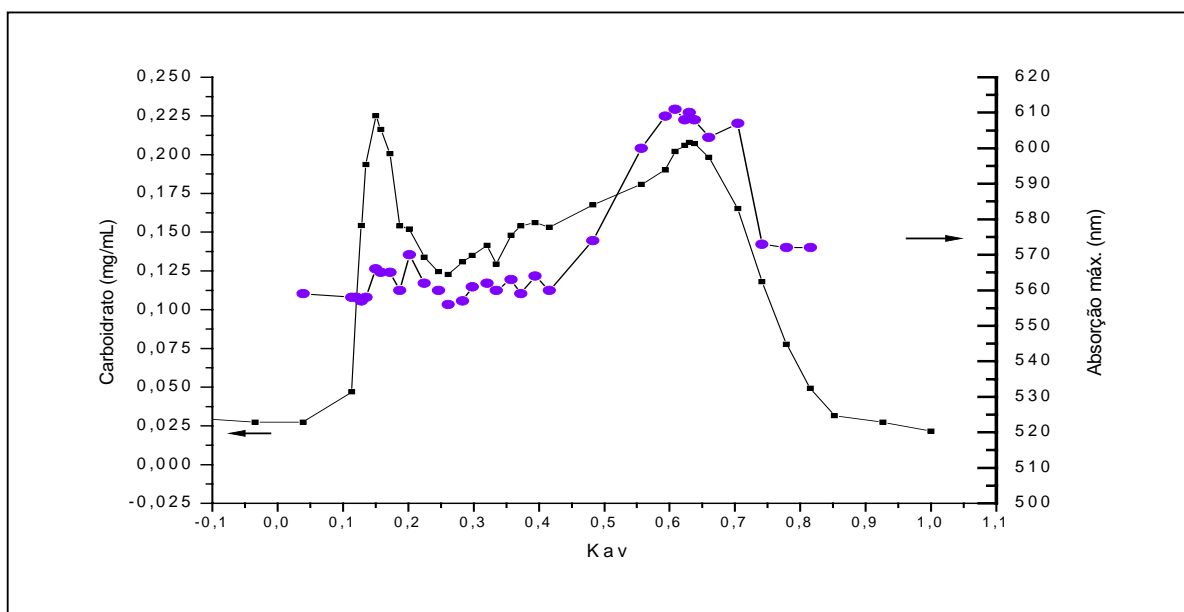


Figura 13 – Perfil de eluição da amostra A2 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

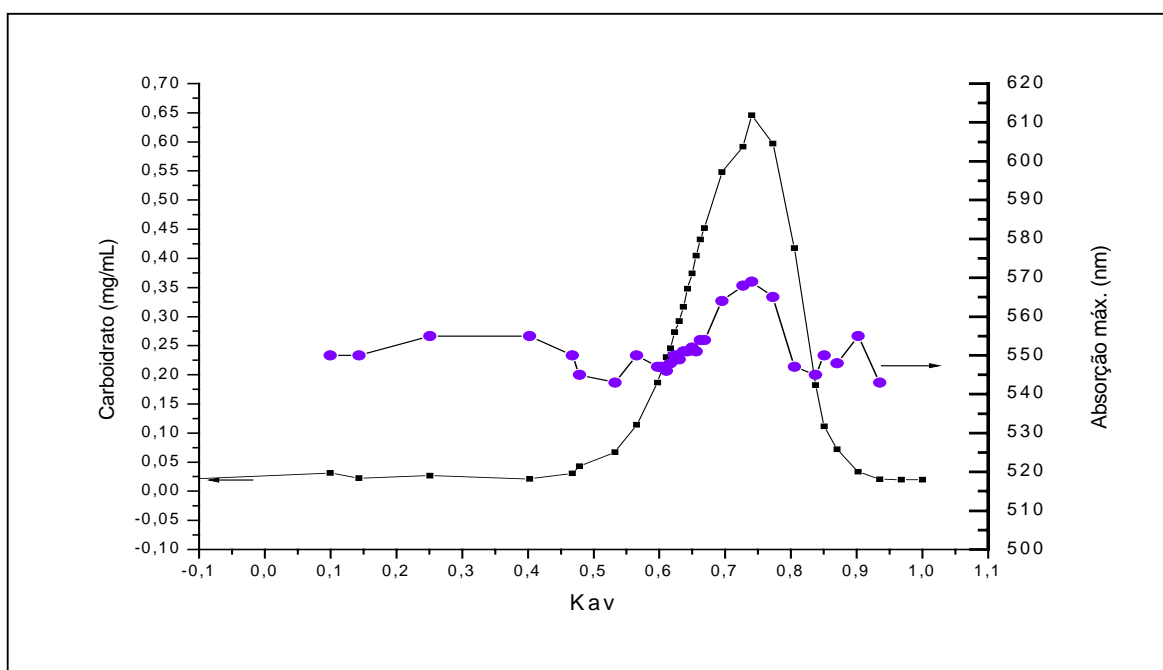


Figura 14 – Perfil de eluição da amostra A3 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

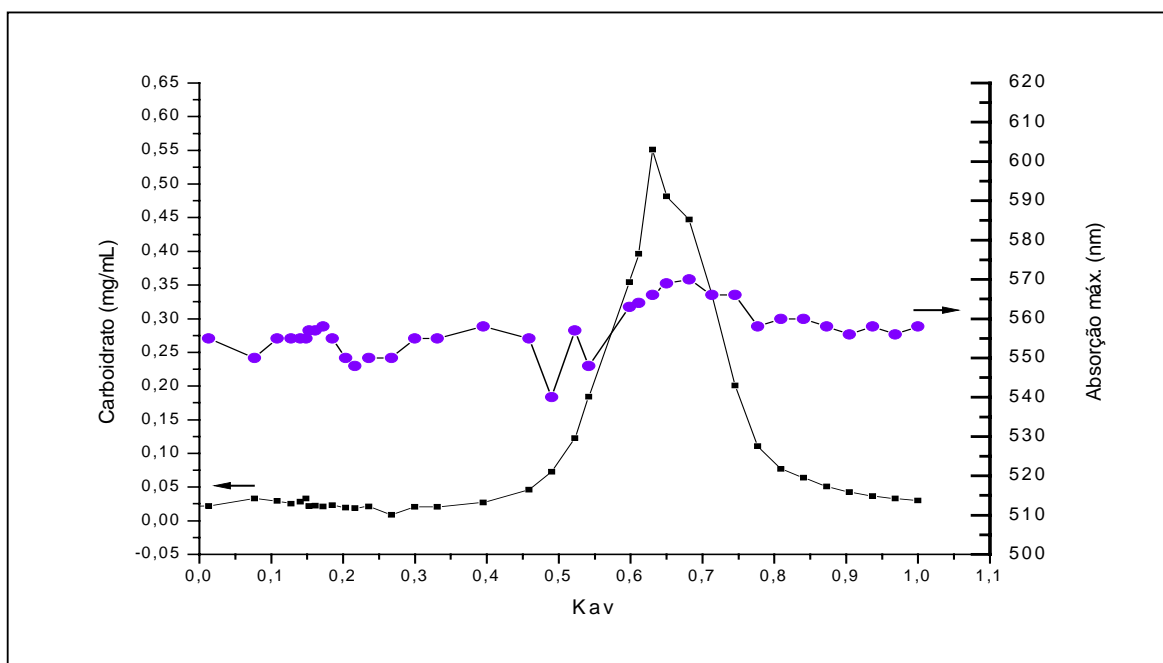


Figura 15 – Perfil de eluição da amostra A4 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

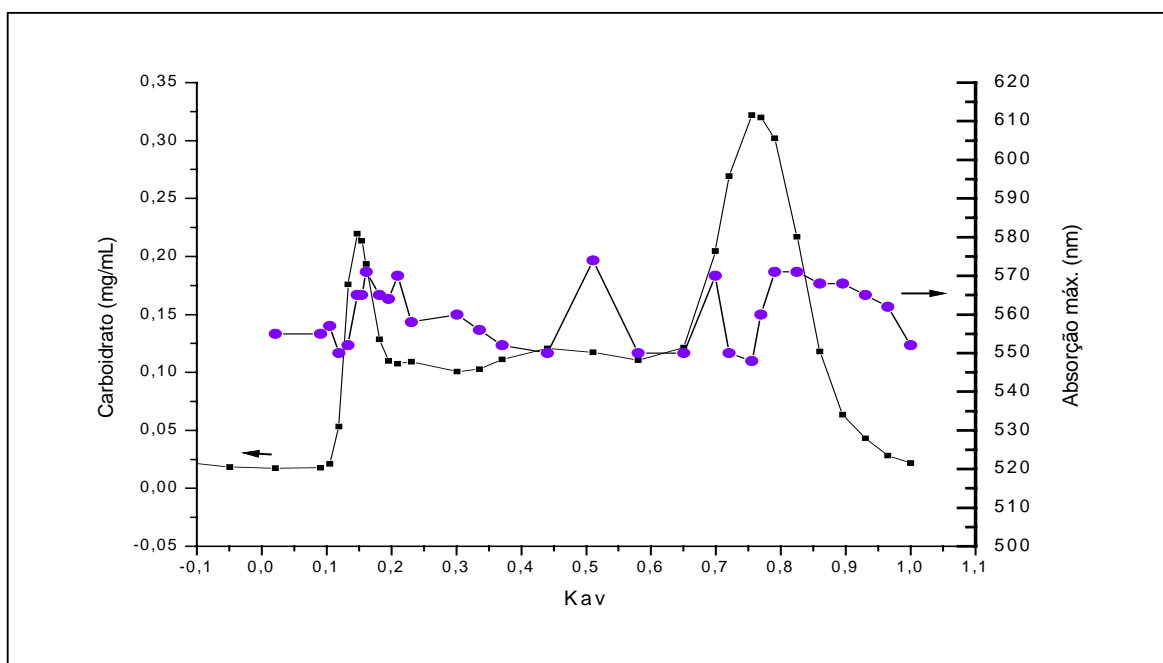


Figura 16 – Perfil de eluição da amostra A5 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

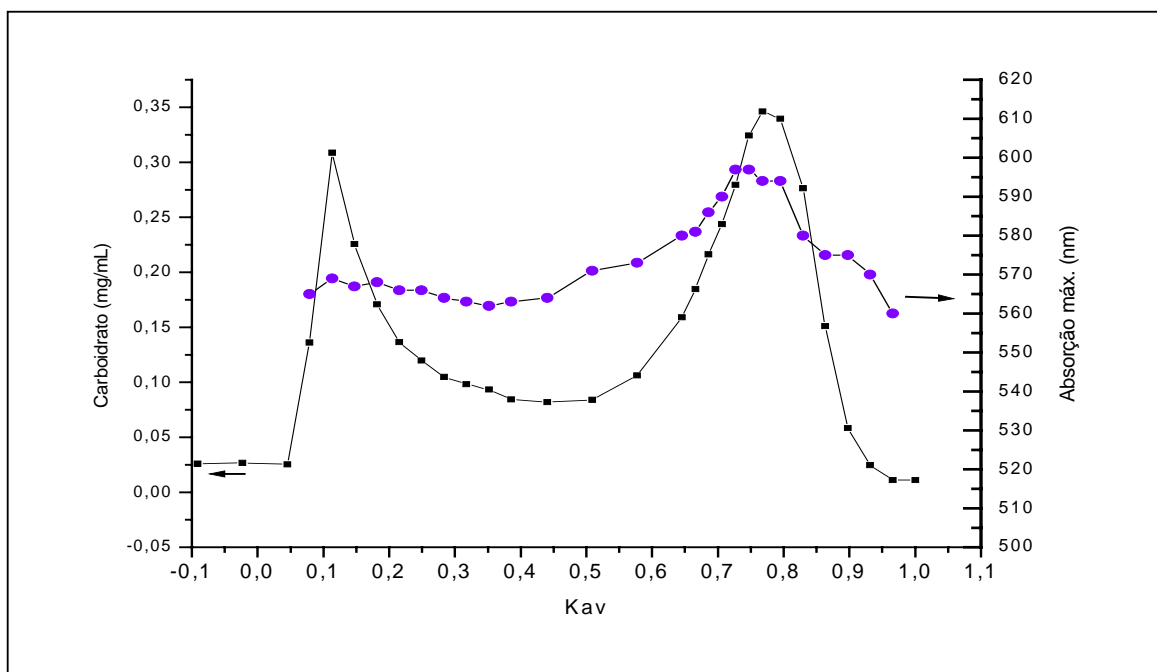


Figura 17– Perfil de eluição da amostra A6 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

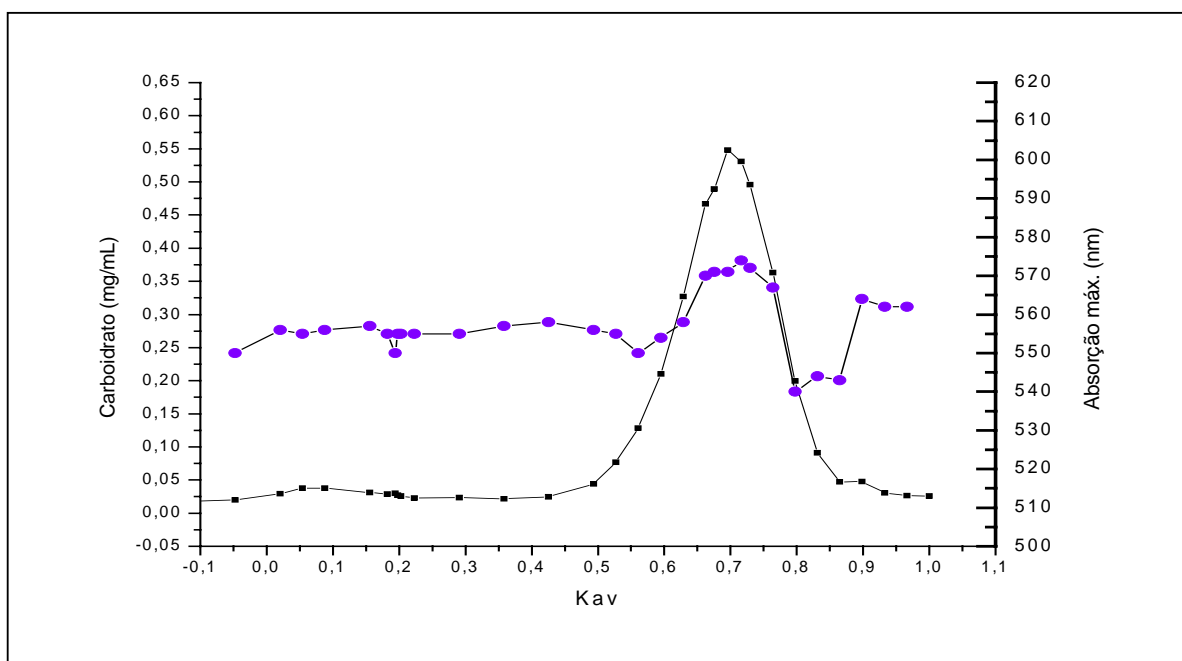


Figura 18 – Perfil de eluição da amostra A7 permeada em gel Sepharose CL2B indicando a concentração de carboidrato e comprimento de onda de máxima absorção.

A partir dos resultados obtidos na permeação de cada amostra, foi montada a Tabela 6 onde são apresentados os valores de  $K_{av}$  dos picos de carboidratos eluídos e o comprimento de onda onde ocorre a máxima absorção do complexo com iodo.

Dois picos característicos deveriam ser apresentados por todas as amostras, ou seja, os biopolímeros amilopectinas e amiloses com características estruturais e pesos moleculares significativamente diferentes permeariam a fase estacionária em tempos diferentes. No entanto, algumas amostras não apresentaram este comportamento e a cromatografia não conseguiu separar as moléculas, a respeito das quais supõe-se terem se entrelaçado e permeado juntamente.

A Tabela 6 mostra os tamanhos moleculares aproximados das cadeias dos biopolímeros de cada fécula, na forma de Grau de Polimerização (GP), ou seja, “unidades de glicose anidra” (peso molecular 162 Da), após permeação no gel Sepharose CL-2B.

Tabela 6 – Valores de  $K_{av}$  dos picos das amostras eluídas e respectivos valores de carboidratos (em mg/mL e GP) e comprimento de onda de absorção máxima ( em nm ).

Amostras	1º pico				2º pico			
	$K_{av}$	CHO	$\lambda$ (nm)	G.P.	$K_{av}$	CHO	$\lambda$ (nm)	G.P.
A1	0,1	0,05	550	5456	0,7	0,47	585	254
A2	0,12	0,225	565	4926	0,65	0,20	610	328
A3	0,10	0,03	550	5456	0,75	0,64	570	197
A4	0,10	0,04	555	5456	0,65	0,55	570	328
A5	0,15	0,22	565	4226	0,75	0,32	570	197
A6	0,10	0,31	570	5456	0,75	0,35	595	197
A7	0,10	0,04	550	5456	0,70	0,55	575	254

Segundo Mua e Jackson (1997) as cadeias poliméricas das amiloses apresentam peso molecular numa faixa de 1,03 a  $4,89 \times 10^5$  Daltons em média contra 7,08 a  $9,88 \times 10^7$  Daltons apresentados pelas amilopectinas. Portanto, teoricamente as amilopectinas deveriam eluir em primeiro lugar devido ao seu maior peso molecular, pois a faixa de exclusão



do gel Sepharose é de  $1 \times 10^5$  a  $2 \times 10^7$ . Considerando que os amidos de diferentes variedades de mandioca apresentam em torno de 20% de amilose e, portanto, maior concentração de amilopectina, estas deveriam eluir em primeiro lugar. No entanto, pelos perfis das permeações nota-se que este fenômeno não ficou bem caracterizado.

A permeação de moléculas padrão de peso molecular conhecido, nas mesmas condições que as amostras, permitiu produzir uma curva que serviu para estimar o peso molecular dos componentes das frações permeadas, segundo seu valor de  $K_{av}$ .

Seguindo a metodologia exposta no item 3.6, obteve-se o gráfico da Figura 19.

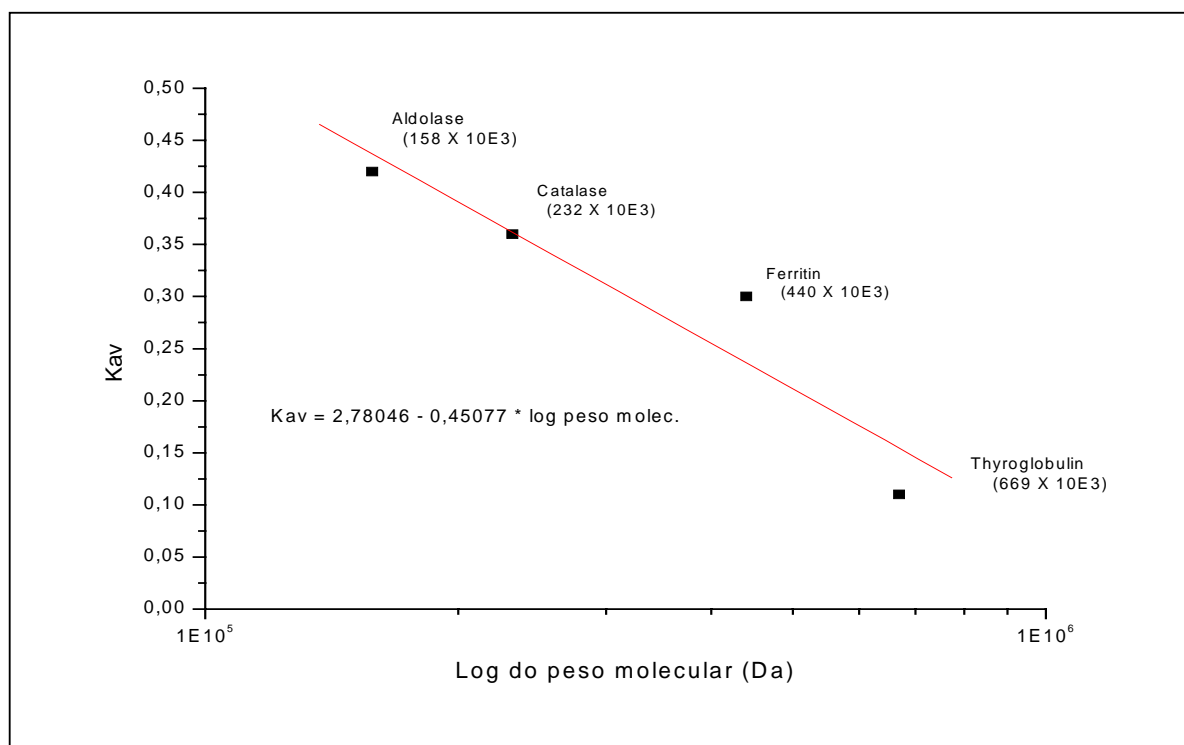


Figura 19 – Curva de calibração com moléculas de proteínas permeadas em gel Sepharose CL-2B.

Foi possível definir o grau de polimerização (GP) dos polissacarídeos permeados através da função ajustada:

$$K_{av} = 2,78046 - 0,45077 * \log \text{ peso molec.}$$

Utilizando esta função aos valores de  $K_{av}$  dos picos de eluição observado nos gráficos das amostras, pode-se estimar o tamanho das cadeias de amilose e/ou amilopectinas naquele ponto.

A distribuição do tamanho das cadeias ramificadas foi verificada utilizando enzimas isoamilase conforme descrito no item 3.3.3. A ação desta enzima se faz por hidrólise das ligações tipo  $\alpha$ -1,6 e deste modo a solução apresenta somente cadeias lineares que puderam ser avaliadas quanto à distribuição por tamanho utilizando o gel Sephadex G-75 como fase estacionária.

Os perfis de eluição das amostras de féculas após hidrólise enzimática podem ser observados nos gráficos das Figuras 20 a 26.

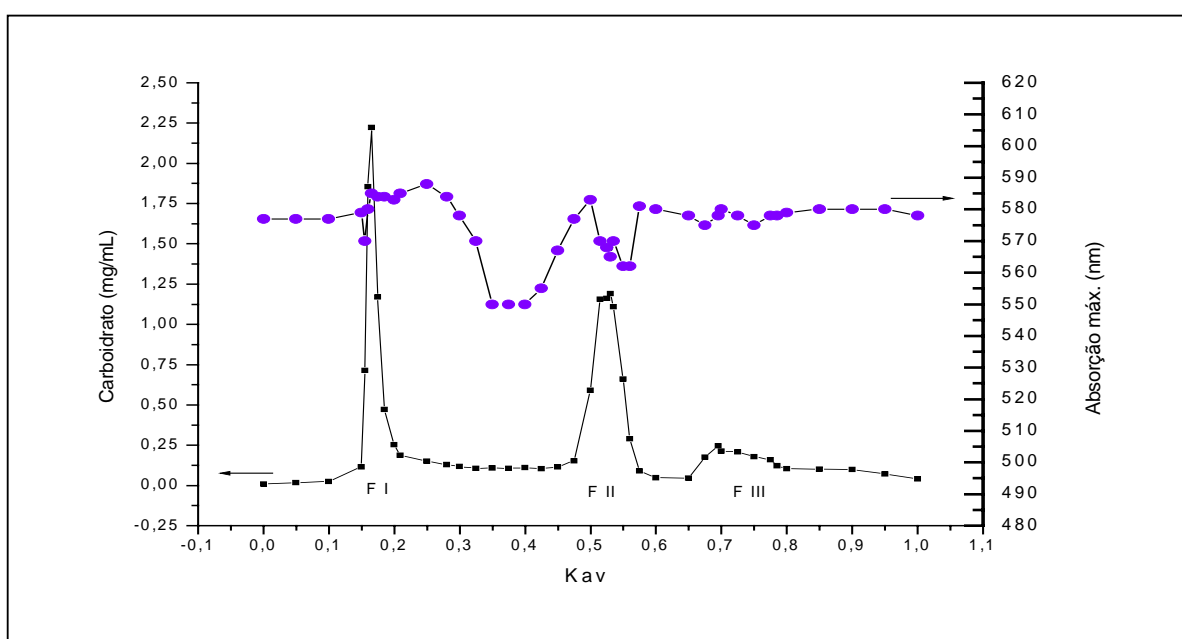


Figura 20 – Perfil de eluição da amostra A1 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

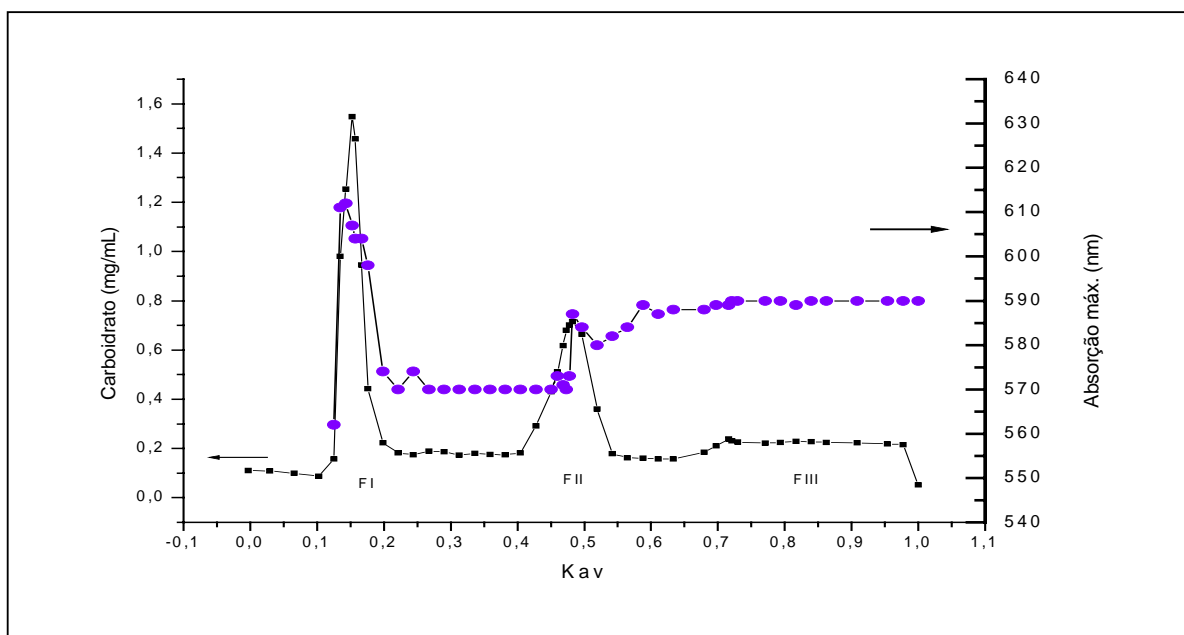


Figura 21 – Perfil de eluição da amostra A2 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

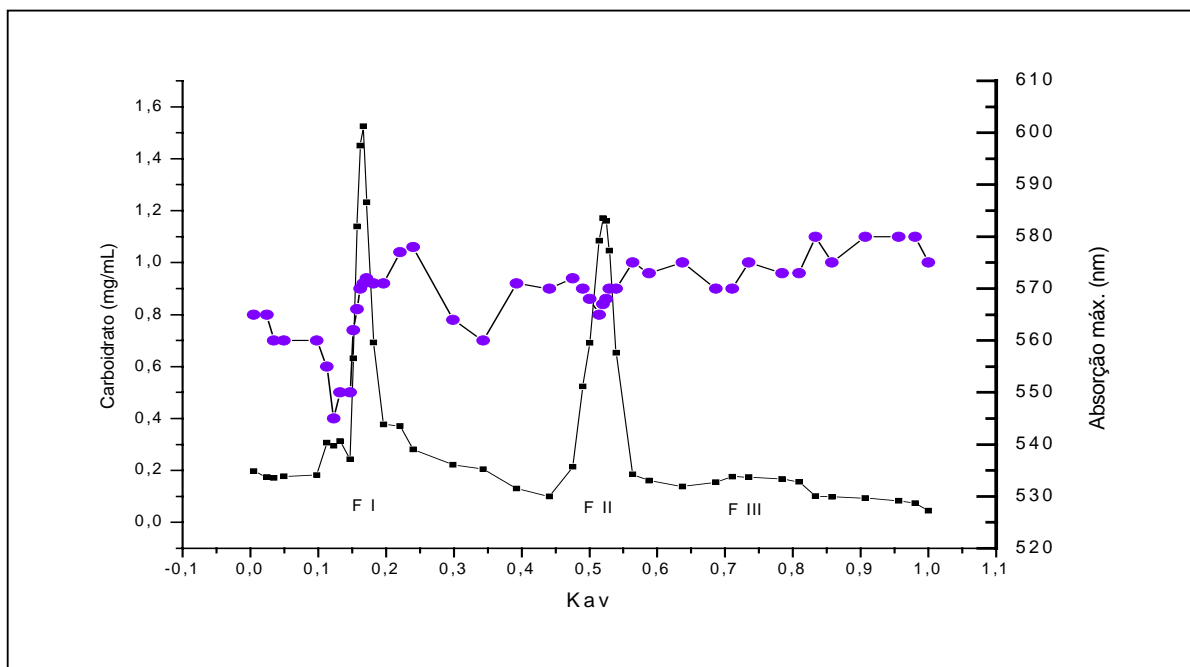


Figura 22 – Perfil de eluição da amostra A3 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

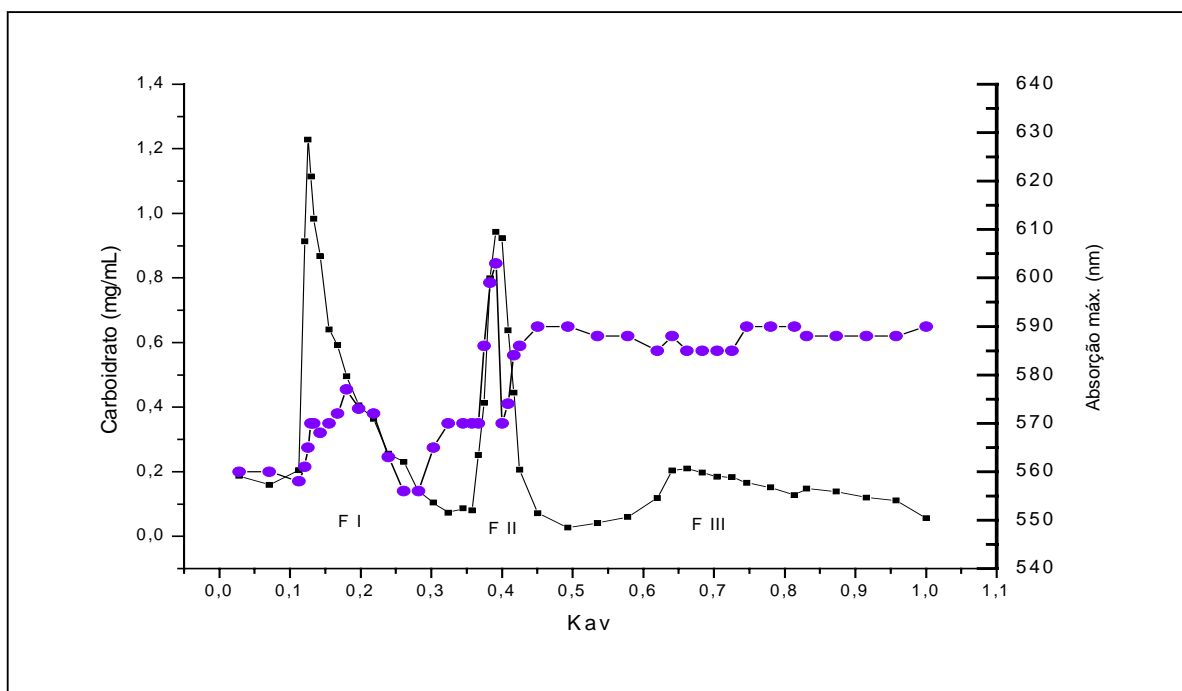


Figura 23– Perfil de eluição da amostra A4 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

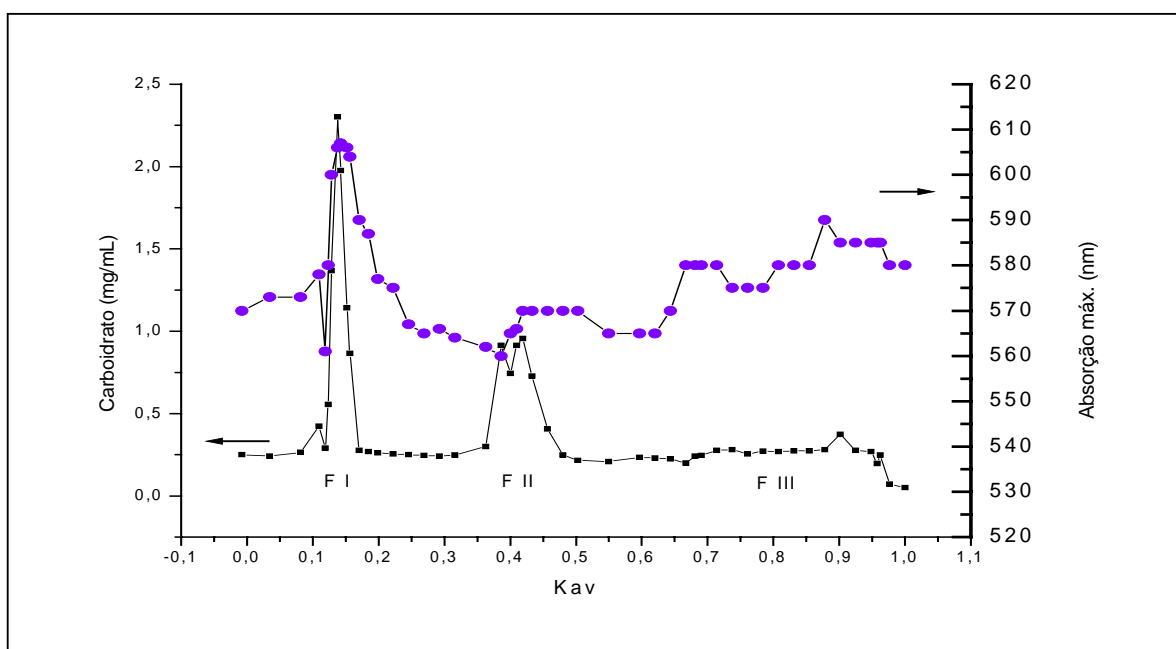


Figura 24 – Perfil de eluição da amostra A5 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

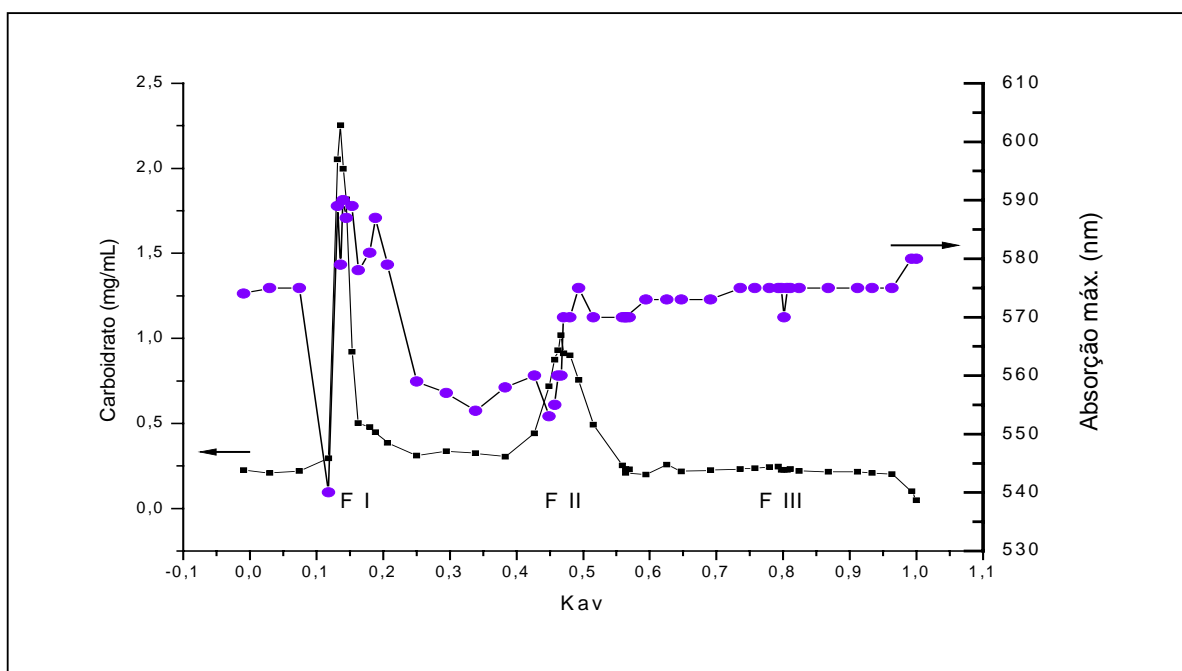


Figura 25 – Perfil de eluição da amostra A6 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

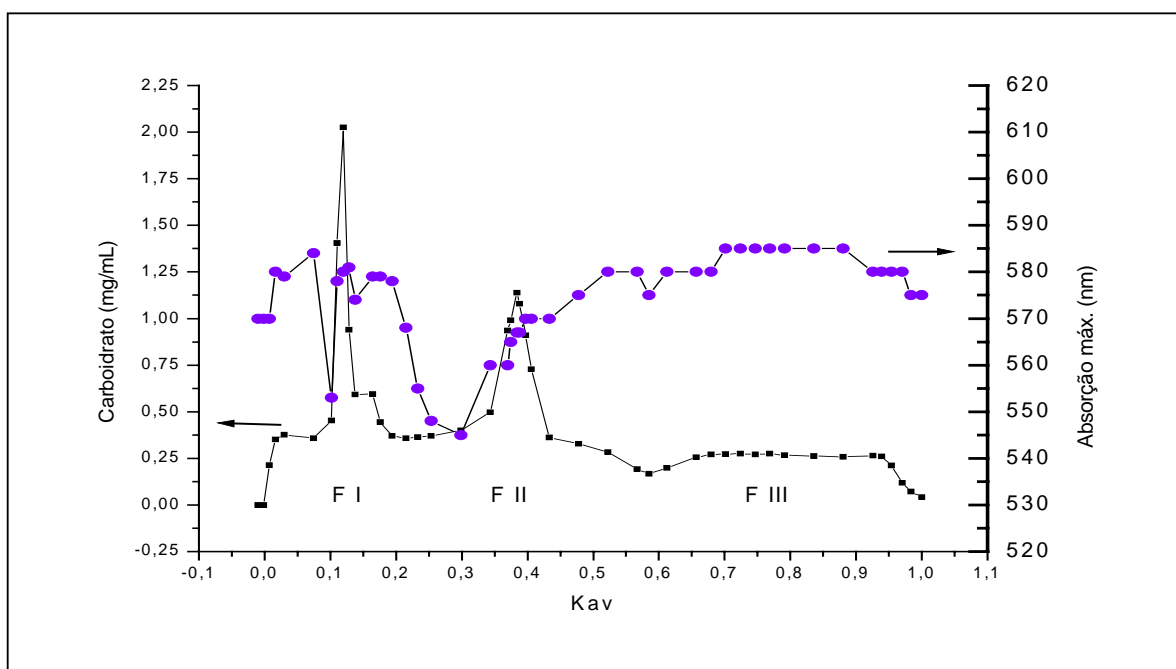


Figura 26 – Perfil de eluição da amostra A7 permeada em gel Sephadex G-75, indicando a concentração de carboidrato e correspondente comprimento de onda de máxima absorção.

Nos gráficos destas permeações estão expressos os picos correspondentes às cadeias moleculares em cada uma das 3 frações características.

As amiloses de cadeias poliméricas de maior tamanho são eluídas na fração I juntamente com algumas moléculas maiores de amilopectinas. Já a fração II contém cadeias menores de amiloses e cadeias do tipo B<sub>2</sub> das amilopectinas (cadeias longas), e finalmente, a fração III é composta preponderantemente de cadeias laterais e cadeias mais curtas do tipo B das amilopectinas e algumas poucas cadeias originais das amiloses (HIZUKURI, 1985).

Na Tabela 7 podem ser observados os percentuais das áreas correspondentes às cadeias das amiloses e das cadeias ramificadas das amilopectinas de cada fécula.

Tabela 7 – Distribuição percentual das áreas dos picos correspondentes às cadeias das amiloses e das cadeias ramificadas das amilopectinas de cada amostra permeada.

Amostras	Fração I (%)	Fração II (%)	Fração III (%)	$\frac{\text{Fração III}}{\text{Fração II}}$
A1	38,1	41,5	20,4	0,49
A2	35,5	32,8	31,7	0,97
A3	48,6	31,9	19,5	0,61
A4	49,1	20,4	30,5	1,49
A5	36,8	32,9	30,3	0,92
A6	41,1	33,2	25,7	0,77
A7	33,5	39,7	26,8	0,67

Os dados expostos na Tabela 7 mostram que as proporções entre as frações são diferentes indicando que provavelmente as cadeias curtas das amilopectinas não foram preponderantes, com exceção da amostra A4, cuja fração III foi maior do que a II.

Os resultados encontrados estão de acordo com os encontrados por Hizukuri (1985), que demonstrou que moléculas de amilopectinas contêm vários tipos de cadeias (A, B e C) com diferenças estruturais. As do tipo A não possuem ramificações e são ligadas às cadeias tipo B e não formam outras cadeias; as do tipo B são classificadas ainda em B1 a B4 ligadas a outras do tipo A ou B; e cadeias do tipo C, que tem a extremidade redutora

da moléculas. O comprimento das cadeias A e B1 são de 14 a 18 unidades glicose; da B2 à B4 são de 45 a 55 unidades. A relação molar entre as cadeias longas e pequenas é influenciada pela fonte e variedade das matérias primas vegetais dos amidos e variam entre 3:1 e 2:1.

Hizukuri (1985) também mostrou que o amido das tuberosas contém poucas cadeias curtas e maior quantidade de cadeias longas em relação às amilopectinas dos cereais, o que pode ser observado nos ensaios realizados, pois os valores da relação Fração III pela Fração II apresentam valores menores que 1, exceto na amostra A4.

A amostra A1 apresentou valores médios de tamanho de cadeias muito próximos para as frações I e II enquanto que a amostra A4 apresentou maior preponderância na fração II.

A amostra A3 apresentou menores proporções (19,5%) de cadeias curtas (fração III) enquanto que a amostra A4 apresentou as maiores (30,5%). De outro lado, a amostra A1 apresenta a maior proporção (41,5%) de cadeias longas (fração II).

A relação entre a fração III e fração II pode ser um indicador do grau de ramificação das amilopectinas, pois quanto maior esta relação, maior é o grau de ramificação delas, indicando então a maior proporção de cadeias curtas (WANG et al., 1993).

Ong et al. (1994) verificaram o grau de polimerização de amilose de mandioca em torno de 3.642 unidades e concluíram que a distribuição das cadeias de amiloses e amilopectinas depende criticamente do método analítico empregado. Utilizaram a cromatografia de alta resolução com coluna de exclusão por tamanho molecular e dois detectores: i) MALLS (*multi-angle-laser-light-scattering*) e, ii) RI (*differential refractometer detector*) para avaliar o peso molecular de amiloses e o tamanho das cadeias de amilopectinas simultaneamente, ou seja, sem isolamento prévia destes biopolímeros.

Ong et al. (1994) também verificaram que o peso molecular das amiloses desramificadas dos amidos que não tenham sido fracionados para separar amilose das amilopectinas são significativamente maiores que os valores relatados na literatura para amiloses previamente fracionadas.

Segundo Yoo e Jane (2002) as propriedades funcionais dos amidos estão diretamente relacionadas com o peso molecular das amiloses e amilopectinas. As separações tendo sido deficientes, não possibilitaram verificar as proporções relativas destes biopolímeros; assim realizou-se uma modificação na forma de eluir as amostras, que foi a

inversão no sentido de injeção, passando a ser em fluxo ascendente. Os resultados mostraram que as moléculas também não foram separadas, pois os picos de absorção de iodo não tiveram efeito discriminador.

Como os resultados indicaram que não houve boa separação entre os biopolímeros de todas as amostras, não foi possível comparar os resultados observados com a literatura, que sempre relata estas medidas a partir das frações amilose e amilopectina separadas.

Sendo assim, aproximações podem ser inferidas para observar semelhanças entre os materiais analisados, quais sejam: para as frações de peso molecular maior em torno de  $9 \times 10^5$  Da, a absorção máxima ocorreu em torno de 550 a 570 nm, característico de amilopectinas e amiloses de baixo peso molecular; e para as frações de peso molecular menor em torno de  $4 \times 10^4$  Da, a absorção máxima ocorreu na faixa de 575 a 610 nm que é característica de cadeias lineares de amiloses e cadeias pequenas, porém muito ramificadas de amilopectinas.

## **4.2 Concentração de amido nas féculas**

Inicialmente se previa determinar a concentração de amidos utilizando uma metodologia na qual o amido, hidrolisado enzimaticamente até monossacarídeos, seria determinado pelo método Somogy-Nelson, calculado como glicose e transformado para amido. Entretanto, a quantidade de análises necessárias por permeação poderia atingir a casa da centena. Considerando-se as várias etapas necessárias para efetuar cada uma dessas análises enzimáticas, que consumiriam um tempo significativo na sua realização, bem como a vulnerabilidade a erros de manipulação, buscou-se uma metodologia mais rápida, mas sem deixar de ser precisa e exata.

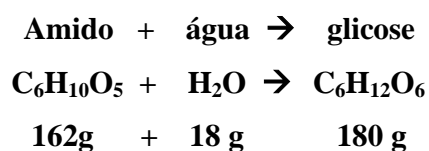


Na Tabela 8 observa-se que a concentração de amido hidrolisado calculado a partir da concentração de açúcares redutores totais foi aumentando em função do tempo de hidrólise e que as correspondentes concentrações de carbono orgânico medidas espectrofotometricamente permaneceram praticamente constantes, com uma pequena tendência a decrescer.

Tabela 8 – Valores da porcentagem de amido hidrolisado e concentração de carbono orgânico em função do tempo de hidrólise.

Tempo de hidrólise (minutos)	Amido hidrolisado (%)	Carbono Orgânico (ppm)
20	7,4	885,2
40	18,0	884,6
60	23,6	881,2
80	33,4	879,1
100	43,8	880,7
120	53,8	880,1

Observa-se este fato que seria devido à reação de hidrólise que ocorre, pois quando se hidrolisa uma ligação glicosídica, ocorre a incorporação do grupo hidroxílico e do cátion hidrogênio e, estequiometricamente, cada mol de glicose produzida, incorpora um mol de água. Deste modo, 1 mol de amido mais 1 mol de água é igual a 1 mol de glicose:



A proporção de carbono na molécula da glicose é de 72 gramas em cada mol e representa 40% do peso total. Fazendo a relação inversa, a massa total de uma amostra seria obtida pelo produto de 2,5 vezes a massa de carbono medida. Sendo assim, tem-se:

$$\text{ART} = \frac{\text{TOC (ppm)} \times 2,5 \times d \text{ (g/L)}}{1000} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

ART - concentração de açúcares redutores totais

TOC - concentração de Carbono Orgânico Total

d - fator de diluição

Semelhantemente, em relação ao amido obtém-se :

$$\text{AMIDO} = \frac{\text{TOC (ppm)} \times 2,25 \times d \text{ (g/L)}}{1000} \quad (\text{Eq. 2})$$

Utilizando a equação 2 para a amostra de concentração 5% de amido, obteve-se um valor teórico de 888,9 ppm de carbono orgânico. Pode-se observar o perfil de evolução da hidrólise em função do tempo no gráfico da Figura 27.

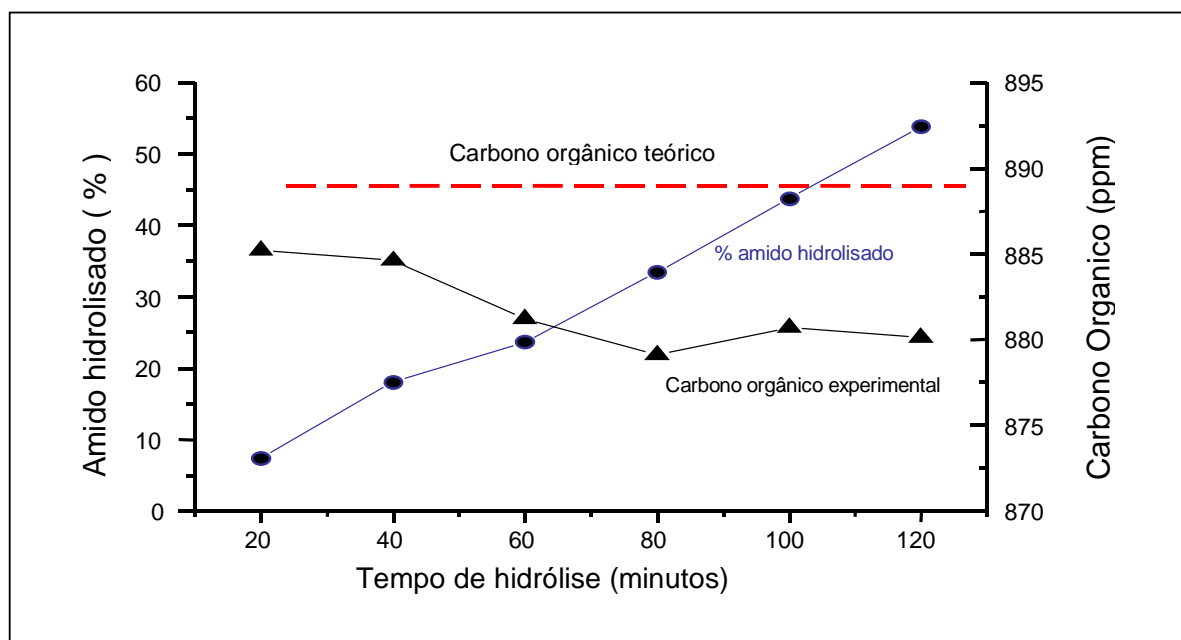


Figura 27 – Gráfico da variação da concentração de amido hidrolisado e do carbono orgânico das amostras em função do tempo e a medida do TOC teórica.

Nesse gráfico os valores correspondem às médias dos ensaios com 3 repetições e observa-se uma pequena tendência de diminuição da concentração de carbono orgânico nas amostras conforme ocorre aumento do teor de açúcares redutores porque estão ocorrendo modificações na composição química do soluto, em função do tempo. Com as informações obtidas do gráfico, recomenda-se a utilização de um tempo máximo de 20 minutos para realizar a hidrólise de uma amostra de fécula e/ou uma porcentagem de amido hidrolisado menor que 10 %, que pode ser verificado através da medida de açúcares redutores totais, para evitar uma maior discrepância entre o valor medido experimentalmente e o teórico.

Esta diferença explica-se pela presença de outros contaminantes na amostra de amido que não sejam carboidratos, como por exemplo sais inorgânicos ligados aos amidos e portanto, não geram indicação de concentração através do TOC. Estes contaminantes na amostra representariam a diferença de 3,7 ppm observada pela diferença entre o valor teórico e o valor medido no tempo de 20 minutos de hidrólise. Utilizando a mesma fórmula especificada na equação 2, este valor alcançaria 0,21 g/L.

Utilizaram-se amostras de féculas extraídas em laboratório, onde a última etapa de separação do amido dos resíduos ligno-celulósicos utiliza uma peneira de malha 50  $\mu\text{m}$ , ou seja, o amido apresenta este contaminante que seria separado somente na etapa de filtração do hidrolisado antes da injeção no analisador de Carbono Orgânico Total (TOC).

Amostras da mesma fécula foram hidrolisadas conforme descrito no item 3.8 e verificou-se experimentalmente que esta parcela de fibras retidas na filtração da amostra foi de 0,034g/L. Portanto, aquela diferença entre os valores teóricos esperados e os verificados experimentalmente, diminuiria para 0,176 g/L ( $0,21 - 0,034$  g/L) e seria devido àqueles outros contaminantes que não possuem carbono orgânico.

A metodologia mostrou-se reprodutiva, com menor consumo de tempo e de baixa complexidade operacional, fatores que diminuem a probabilidade de erros de manipulação.

### 4.3 Concentração de amilose e amilopectina na fécula

As concentrações relativas de amiloses e amilopectinas das amostras ensaiadas podem ser vistas na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentração de amilose das amostras de féculas.

<b>Amostras</b>	<b>Teor amilose (%)</b>	<b>Teor amilopectina (%)</b>
A1	17,17	82,83
A2	18,92	81,08
A3	18,00	82,00
A4	19,35	80,65
A5	17,49	82,51
A6	18,96	81,04
A7	19,67	80,33

Estes valores indicam que as 7 variedades apresentam variação máxima de 2,5 % entre a menor e a maior concentração e portanto, o que poderia diferenciá-las seria a estrutura molecular destas amiloses e amilopectinas, quando foram ensaiadas utilizando permeação no gel G-75 após tratamento com isoamilase.

#### 4.4 Análises viscográficas das féculas

As féculas de mandioca são caracterizadas por possuírem baixas concentrações de matérias graxas, proteínas e fósforo de modo que estes compostos e seus complexos não apresentariam influências nas suas propriedades de pastas. As propriedades viscoamilográficas são consideravelmente afetadas pelas concentrações de amilose e amilopectinas e principalmente pelo tamanho destes biopolímeros no gel.

Nas Figuras 28 a 34 são mostrados os perfis viscográficos das amostras de fécula de mandioca analisadas no Viscoanalisador RVA com duas repetições por amostra, conforme descrito no item 3.9.

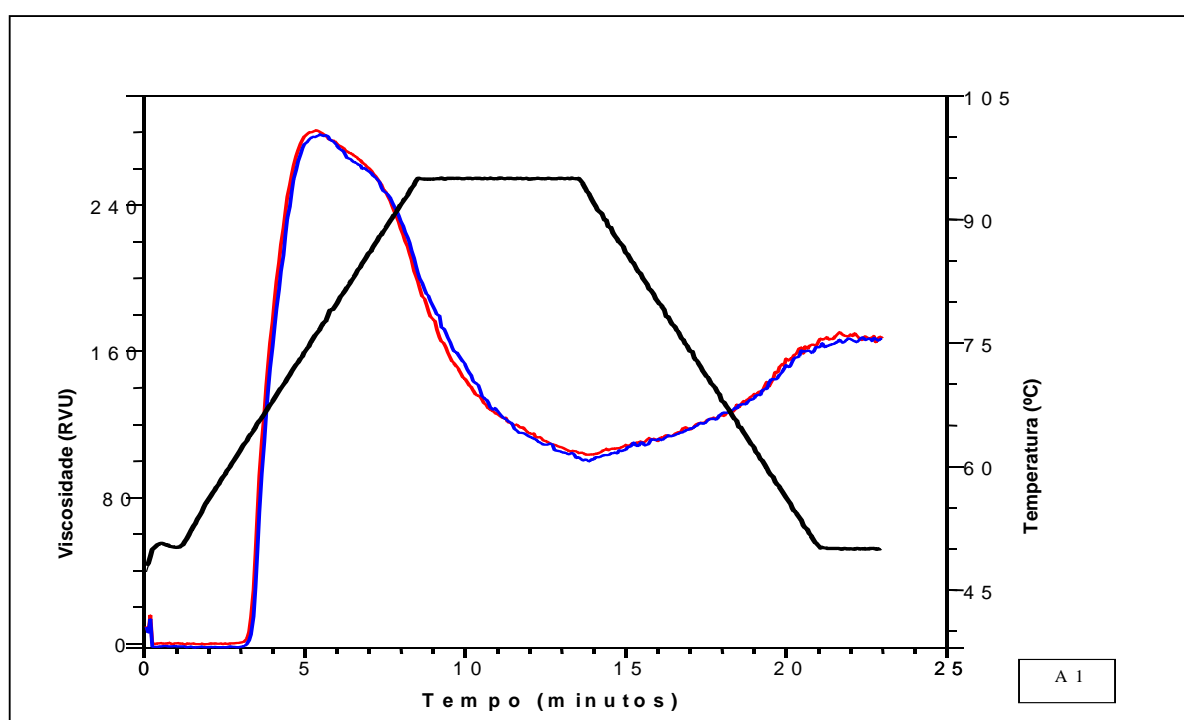


Figura 28 – Perfis viscoamilográficos da amostra A1.

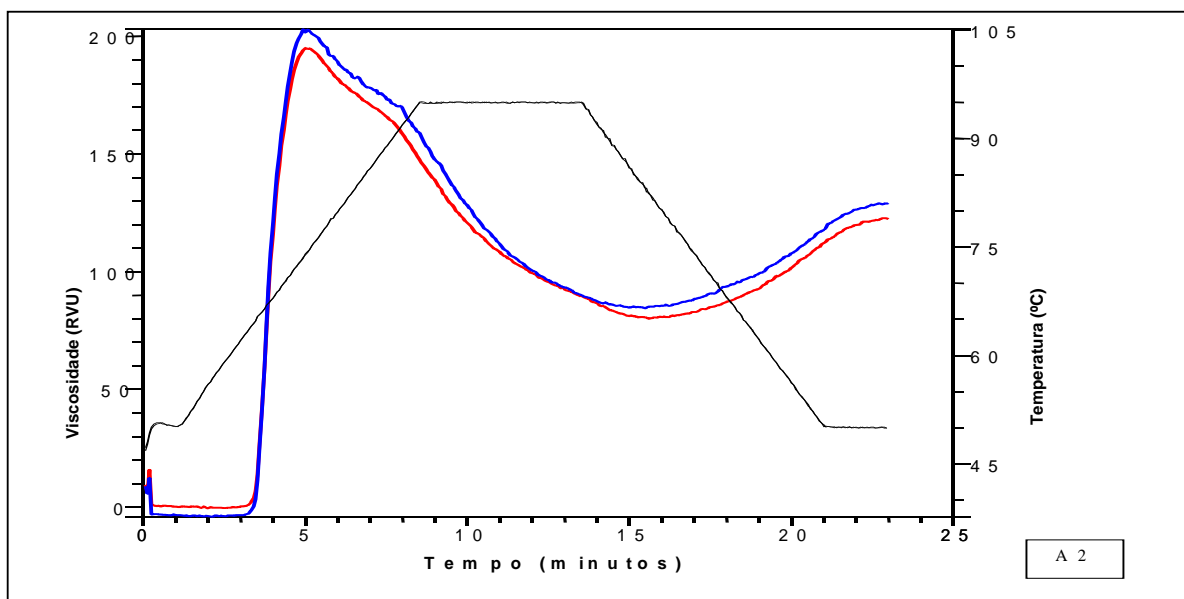


Figura 29 – Perfis viscoamiliográficos da amostra A2

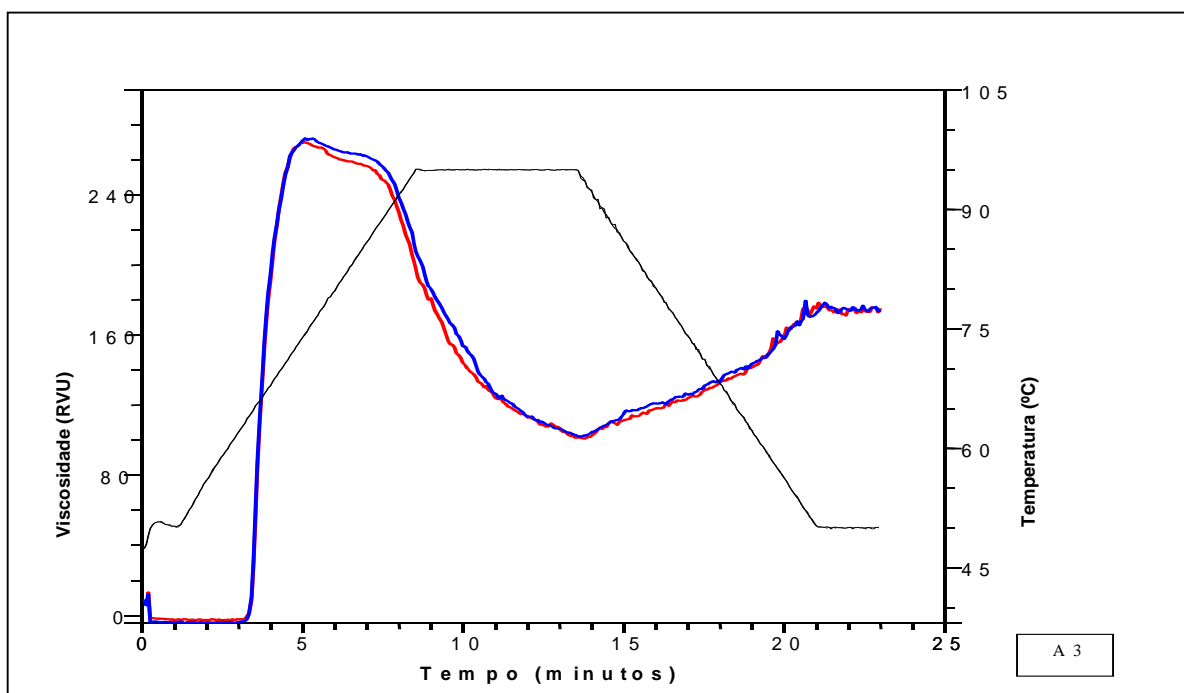


Figura 30 – Perfis viscoamiliográficos da amostra A3.

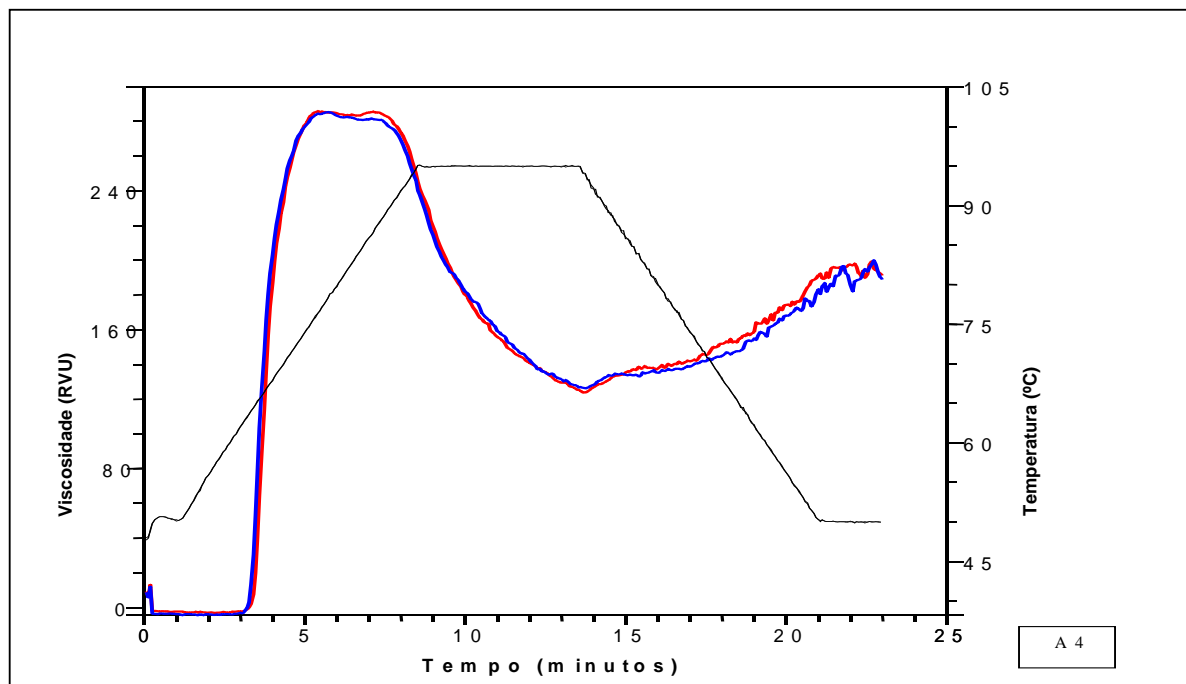


Figura 31 – Perfis viscoamilográficos da amostra A4.

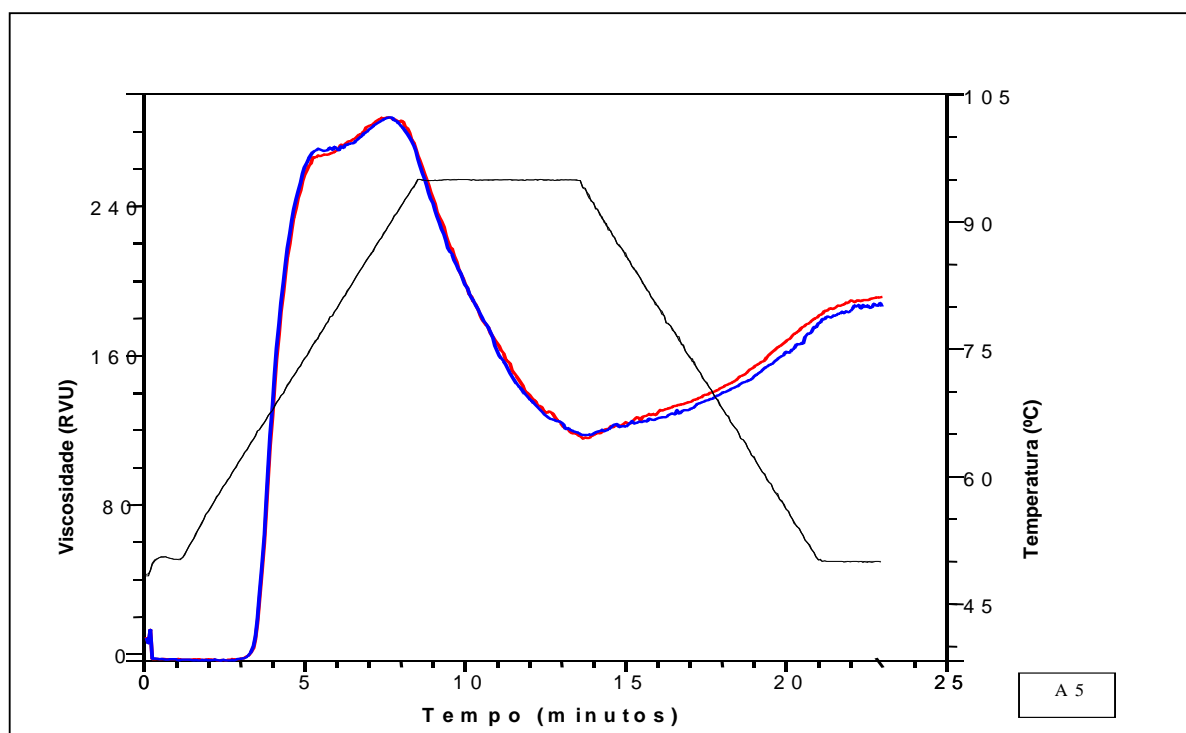


Figura 32 – Perfis viscoamilográficos da amostra A5

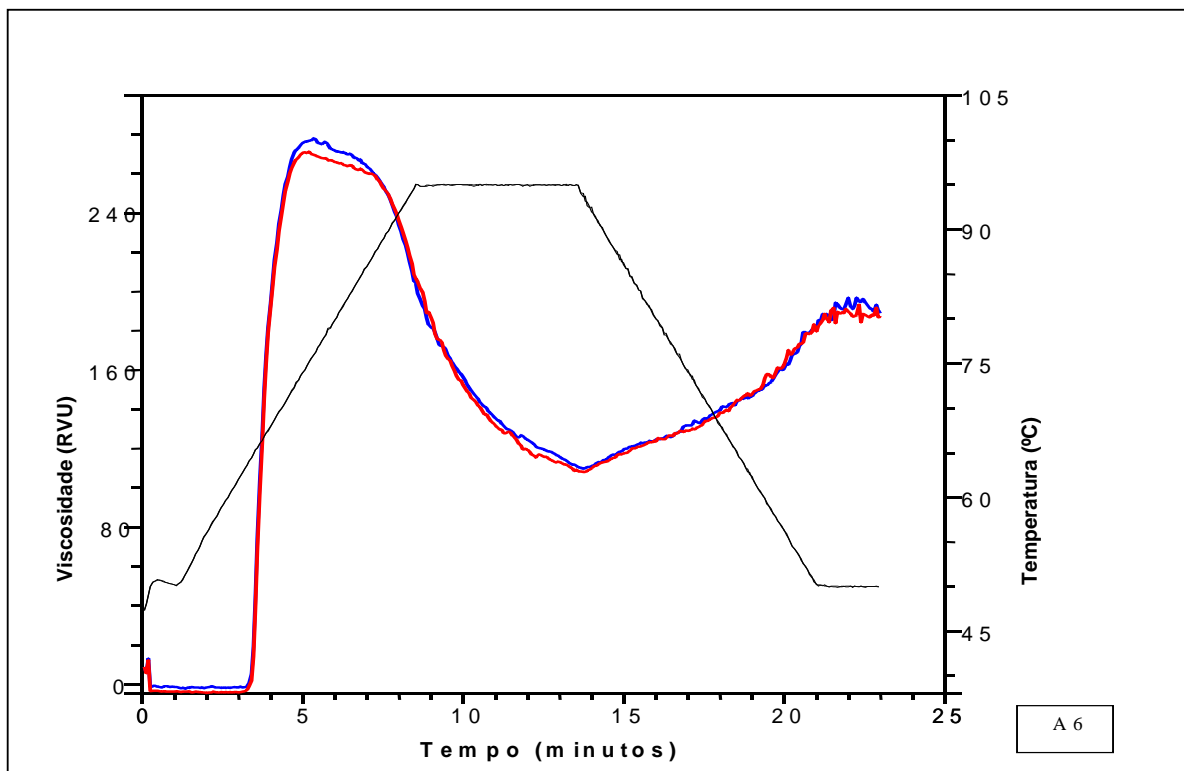


Figura 33 – Perfis viscoamiliográficos da amostra A6.

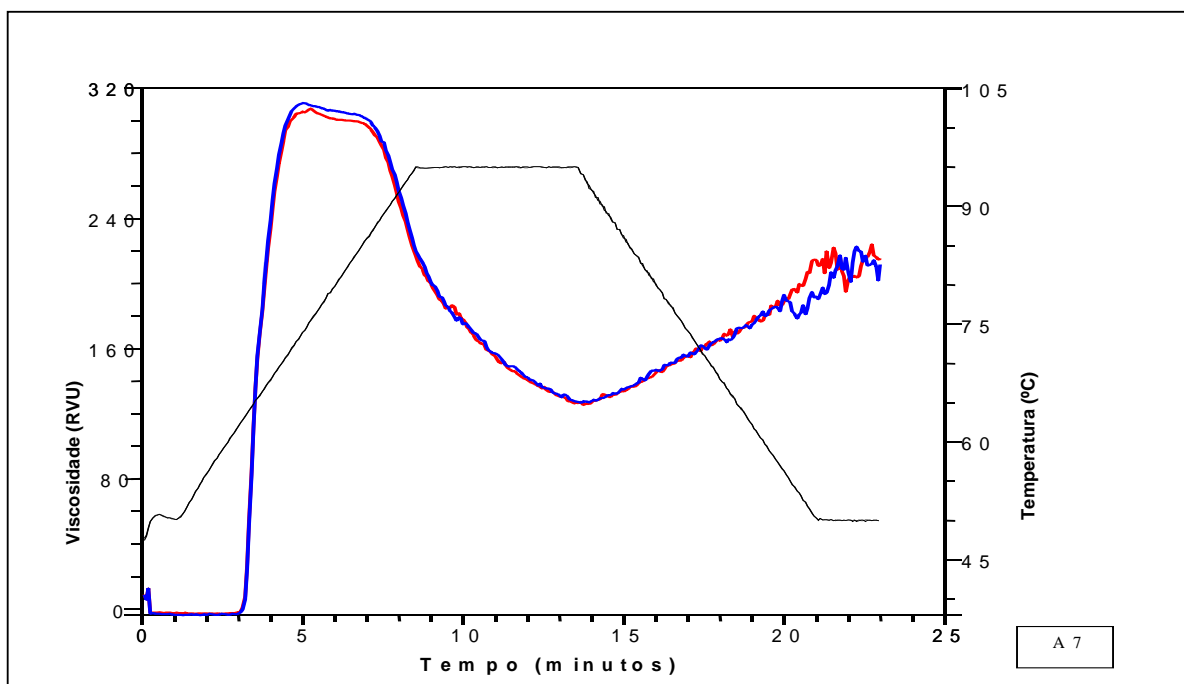


Figura 34 – Perfis viscoamiliográficos da amostra A7.



Os gráficos forneceram dados para a confecção da Tabela 10, onde os seguintes parâmetros médios de cada amostra são expostos: pico de viscosidade (RVU), *breakdown* (RVU), viscosidade final (RVU), *setback* (RVU), tempo do pico máximo (minutos) e temperatura de gelatinização (°C).

Tabela 10 – Parâmetros viscoamilográficos médios obtidos pelo RVA nos ensaios das amostras de féculas.

Amostras	Viscosidade (RVU)				Tempo do pico (min.)	Temperatura Gelat. (°C)
	Pico	Breakdown	Final	Setback		
A1	280,0	178,3	167,0	65,4	5,4	64,6
A2	199,0	116,8	125,7	43,6	5,0	65,8
A3	271,1	169,9	174,8	73,6	5,1	64,4
A4	285,5	160,7	190,0	65,2	5,6	64,4
A5	287,6	171,3	188,9	72,6	7,5	66,0
A6	274,6	165,7	188,2	79,3	5,3	64,8
A7	309,0	183,1	213,5	87,6	5,1	63,2

Com relação ao primeiro dos parâmetros, ou seja, o valor do pico de viscosidade em RVU, observa-se que as amostras A2 e A7, apresentaram valores diferentes dos encontrados nas outras amostras, sendo o primeiro abaixo e o outro acima. Hoover (2001) utilizando um viscoamilógrafo Brabender, observou para 5 diferentes variedades de *Manihot esculenta* Crantz em concentração de 6% (p/p), que o pico de viscosidade ocorreu em 590 BU (unidades Brabender), mas não há como transformar este valor em RVU, pois as concentrações das suspensões são diferentes. O valor da viscosidade máxima fica então dependente da concentração de amido utilizada e deste modo, considerar o valor da retrogradação é de maior importância.

O valor da quebra de viscosidade (*breakdown*) pode ser atribuído à estrutura cristalina do grânulo, conteúdo de matéria graxa e amiloses. Amidos de milho, trigo e arroz apresentam baixos valores de retrogradação (SINGH et al., 2003). A consistência de pastas de amidos de mandioca aumenta pouco com o resfriamento, indicando um baixo

potencial de formação de gel, ao contrário do que ocorre com cereais e leguminosas (RICKARD et al., 1991). Talvez as moléculas mais longas das amiloses da mandioca apresentem uma tendência menor à retrogradação e uma força de ligação mais elevada, se comparada às amiloses de baixo grau de polimerização como são as do milho e trigo.

Parker e Ring (2001) observaram que no início da retrogradação ocorria a participação efetiva das amiloses que iniciavam a organização de estruturas cristalinas, que após alguns dias não se concretizavam. Provavelmente formam-se duplas hélices na forma de fractais e este processo de agregação estaria ligado à uma separação de fases ocorrendo regiões de alta concentração de amiloses e outra de baixa concentração de amiloses no gel. Estes autores citam também que em análises do comportamento de amilopectinas de diferentes fontes botânicas foi observado que longas cadeias poliméricas e numerosa fração de cadeias curtas nas amilopectinas, apresentam grande tendência à retrogradação e cristalização em soluções aquosas. As amilopectinas do trigo apresentam pequeno tamanho e pequena quantidade de frações de cadeias curtas, geralmente mostram pequena tendência a retrogradar.

Na metodologia utilizada na análise pelo RVA, gelatiniza-se a amostra de amido e após atingir um pico de máxima viscosidade, enquanto a temperatura do gel é mantida a 95°C, ocorre uma diminuição brusca da viscosidade até atingir um valor mínimo. No momento em que se promove um resfriamento até a temperatura de 50°C, ocorre um aumento da viscosidade devido à retrogradação.

Observando os dados da Tabela 9 verifica-se que a amostra A7 apresentou a maior viscosidade de pico (309,0 RVU) e a menor temperatura de pasta (63,2°C), com o segundo menor tempo para gelatinização (5,1 minutos). Apresenta ainda a maior sensibilidade à temperatura e/ou atrito mecânico, evidenciado pelo maior valor do breakdown ou quebra (183,1 RVU) e ainda um maior valor de setback ou retrogradação (87,6 RVU).

No outro extremo, a amostra A2 apresentou a menor viscosidade de pico (199,0 RVU), a segunda maior temperatura de fusão (65,8°C) com o menor tempo para gelatinização (5,0 minutos). Apresenta o valor mais baixo de quebra (116,8 RVU) e o menor valor de retrogradação (43,6 RVU).

As concentrações de amilose destas duas variedades comparadas (A2 e A7 ) estão muito próximas entre si, com uma diferença de apenas 3,8 % entre elas, de modo que não explicam este comportamento tão diferente.

Segundo McPherson e Jane (1999) as moléculas lineares associadas mantêm a integridade de sua configuração original no grânulo e dão maior resistência à agitação mecânica e temperaturas de pastas e de outro lado contribuem para um baixo pico de viscosidade e também alta tendência a retrogradação, devido à pequena desorganização realizada no grânulo pelo efeito da fusão.

Por outro lado, a análise do perfil de permeação em gel G-75 indica a existência de maior concentração de cadeias de pequeno tamanho originária na grande maioria das amilopectinas desramificadas e que atuam no sentido de “atrapalhar” a retrogradação das amiloses ao competir com as associações por pontes de hidrogênio.

Os resultados sugerem que o amido da amostra A2 possui uma organização no grânulo muito forte, que necessita de maior quantidade de energia para ser rompida e parcialmente porque apresenta um baixo valor de quebra e retrogradação pequena, pois afinal não disponibilizou suficiente biopolímero para efetuar a reassociação. Forma géis fortes de aplicação em alimentos.

A amostra A7 apresentou baixa temperatura de pasta (organização fraca no grânulo) e reduzido tempo para atingir a fusão, indicando ser amido de fácil cozimento, de aplicação em macarrões tipo instantâneos, por exemplo. Seu processamento é prejudicado pela alta sensibilidade ao atrito mecânico, pois tem alto valor de quebra e retrogradação, que originariam géis fracos e indesejáveis.

As outras amostras: A1, A3, A4, A5 e A6 apresentaram todos os outros valores semelhantes, com pequenas variações, exceto a amostra A5 quanto ao parâmetro tempo para o amido atingir o ponto de máxima viscosidade (7,5 minutos). Isto indica uma forte arrumação interna no grânulo, talvez por conta da existência de cadeias ramificadas de maior peso molecular nas amilopectinas.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que, os melhores resultados foram obtidos nas permeações em gel Sepharose CL-2B, após as amostras terem sido tratadas com NaOH 1M, bem como em gel Sephadex G-75, após as amostras terem sido hidrolisadas com a enzima isoamilase.

A metodologia de permeação em gel de exclusão por tamanho a pressão normal (GPSEC), foi importante por possibilitar a coleta de frações, com as quais foram possíveis realizar várias análises de caracterização, e deste modo, cruzar as informações validando os resultados.

A distribuição das cadeias dos biopolímeros por si só não permitiu observar uma correlação com o comportamento viscoamilográfico das amostras, pois não pôde ser observada uma relação de causa e efeito. As amostras apresentaram comportamentos que não puderam ser usados para discriminá-las pelas metodologias aplicadas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH **Gel filtration**, 8. ed. Londres: [s.n.], 1998. 103 p.  
ISBN 91-97-0490-2-6

BELLO-PEREZ, L.A. et al. Amylopectin – properties and fine structure. **Food Chemistry**,  
v. 56, n. 2, p. 171-176, 1996.

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents.  
**Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 69, p. 60-78, 1991.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo:  
Varela, 1989. p. 11-70.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo:  
Varela, 1992. p. 51-79.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**,  
v. 23, p. 85-112, 1998.

CHEETHAM, N.W.H.; TAO, L. The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 4, p. 251-261, 1997.

CHEN, Y.; FRINGANT, C.; RINAUDO, M. Molecular characterization of starch by SEC: dependance of the performances on the amylopectin content. **Carbohydrate Polymers**, v.33, p. 73-78, 1997.

CIACCO, C.F.; D'APPOLONIA, B.L. Functional properties of composite flours containing tuber flour or starch. **Baker's Dig.**, v. 51, n. 5, p. 46-50, 1977.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1990. 279 p.

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

CURÁ, J.A; JANSSON, P.G.; KRISMAN, C.R. Amylose is not strictly linear. **Starch/Stärke**, v. 47, n. 6, p. 207-209, 1995.

FREDRIKSSON, H. et al. Calibration of a size-exclusion chromatography system using fractions with defined amylopectin unit chains. **Journal of Chromatography A**, 768, p. 325-328, 1997.

FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. **Starch: chemistry and technology**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 183-247.

FUWA, H. et al. Characterization of high-amylose type endosperm starches of rice plants cultivated in Asia. **Starch**, v. 44, p. 203-205, 1992.

GALLANT, D.J. et al. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 46, p. 3-16, 1992.

GALLANT, D.J.; BOUCHETT, B.; BALDWIN, P.M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 177-191, 1997.

GALLIARD, D.T.; BOWLER, P. Morphology and composition of starch. In: GALLIARD, D.T. **Starch: properties and potencial**. Chichester: Willey, p. 55-78, 1997.

GÉRARD, C. et al. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 19-27, 2001.

HIZUKURI, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. **Carbohydrate Research**, v.141, p. 295-306, 1985.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

IKAWA, Y.; GLOVER, D.V.; SUGIMOTO, Y.; FUWA, H. Some structural characteristics of starches of maize having a specific genetic background. **Starch**, v. 33, p. 9-13, 1981.

INOUCHI, N.; GLOVER, D.V.; TAKAYA, T.; FUWA, H. Development changes in fine structure of starches of several endosperm mutants of maize. **Starch**, v. 35, p. 371-376, 1983.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6647: Norme Internacionale: Riz determination de la teneur en amylose**. Suisse, p. 4, 1987.

JANE, J.; CHEN, Y.Y.; LEE, L.F.; MCPHERSON, A.E.; WONG, K.S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAN, T. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 629-637, 1999.

JANE, J.L.; ROBYT, J.F. Structure studies of amylose V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylase and a new method for preparing amyloextrins. **Carbohydrate Research**, v. 132, p. 105-110, 1984.

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

KENNEDY, J.F. et al. Fractionation of starch amylopectin and amylose by high performance gel filtration chromatography. **Starch**, v. 44, p. 53-55, 1992.

KNUTSON, C.A. Evaluation of variations in amylose-iodine absorbance spectra. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 65-72, 1999.

LEACH, H.W.; SCHOCH, T.J. Structure of the starch granules.III Solubilities of granular starches in dimethyl sulfoxide. **Cereal Chemistry**, v. 39, p. 318-327, 1962.

LEONEL, M. et al. Processamento de araruta (*Maranta arundinacea*) para extração e caracterização da fração amilácea. **Braz. J. Food Technol. Preprint serie**, n. 93, p. 151-155, 2002.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial**: revelacion alimentare de la produccion agricola. Ed. Acribia. S.A. Paris, cap. 11, 1997, p. 283-293.

LLOYD, J.R. et al. Determination of the effect of *r* and *rb* mutations on the structure of amylose and amylopectin in pea (*Pisum sativum* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 45-49, 1996.

MCPHERSON, A.E.; JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. **Carbohydrate Polimers**, v. 40, p. 51-70, 1999.



MESTRES, C. Los estados físicos del almidon. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ALMIDON, 1996, Quito. **Anais...** Quito: Escuela Politécnica Nacional, Instituto de Investigación Tecnológica, 1996, p.1-16.

MOORE, C.O. et al. Applications of starches in foods. In: WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. **Starch: chemistry and technology**. New York, Academic Press, 1984. p. 575-591.

MORRISON, W.R. Starch lipids and how they relate to starch granule and functionality. **Cereal Foods World**, v. 40, p. 437-446, 1995.

MORRISON, W.R. et al. Swelling and gelatinization of cereal starch. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 385-390, 1993.

MUA, J.P.; JACKSON, D.S. Relationships between functional attributes and molecular structures of amylose and amylopectin fractions from corn starch. **J.Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 3848-3854, 1997.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, 153, p. 375-380, 1944.

ONG, M.H. et al. Simultaneous determinations of the molecular weight distributions of amyloses and the fine structures of amylopectins of native starches. **Carbohydrate Research**, v. 260, p. 99-117, 1994.

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

PERONI, F.H.G. **Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas**. 2003. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2003.

RAPHAELIDES, S.; KARKALAS, J. Thermal dissociation of amylose-fatty acid complexes. **Carbohydrate Research**, v. 172, p. 172-177, 1988.

RICKARD, J.E.; ASAOKA, M.; BLANSHARD, J.M.V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Sciences**, v. 31, p. 189-207, 1991.

RICKARD, J.E.; BEHN, K.R. Evaluation of acid and enzyme hydrolytic methods for determination of cassava starch. **J. Sci. Food Agric.**, v. 41, p. 373-379, 1987.

RING, S.G.; I'ANSON, K.J.; MORRIS, V.J. Static and dynamic light scattering studies of amylose solutions. **Macromolecules**, v. 18, p. 182-188, 1985.

ROGER, P. et al. Isolation and Characterization of Single Chain Amylose. **Journal of Cereal Science**, v. 24, p. 247-262, 1996.

SARMENTO, S.B.S. **Caracterização da fécula de mandioca (*Manihot esculenta*) no período de colheita de cultivares de uso industrial**. 1997. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1997.

SHANNON, J.C., GARWOOD, D.L. Genetics and physiology of starch developments. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N., PASCHALL, E.F. (Eds) **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 1984. p. 25-86.

SILVA, F.I.; CABELLO, C. Determinação da concentração de amido em amostras de féculas de raízes tropicais, por espectrofotometria gasosa. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE RAÍCES Y TUBÉRCULOS, 2., Lima. **Anais...** Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina, 2001. FS-P-8.

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

SMITH, A.M.; DENYER, K.; MARTIN, C. The synthesis of starch granule. **Plant Physiol.**, v. 48, p. 67-87, 1997.

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **J. Biol. Chem.**, p. 69-73, 1945.

SONG, Y.; JANE, J. Characterization of barley starches of waxy, normal, and high amylose varieties. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 365-377, 2000.

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

TAKI, M. et al. Gel chromatography of residue and extract obtained from starch granules by hot aqueous 1-butanol solution treatment. **Starch**, v. 40, p. 177-181, 1988.

TESTER, R.F.; MORRISON, W.R. Swelling and gelatinization of cereal starches. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 558-563, 1990.

THOMAS, D.J.; ATWELL, W.A. **Starches**: practical guides for the food industry. Minnesota: Eagan Press, 1999. 94 p.

WALKER, C.E. et al. Accelerated characterization of starch paste viscosity and setback with the rapid visco-analyzer. **Cereal Foods World**, v. 33, p. 491-494, 1988.

WANG, Y.J. et al. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 171-179, 1993.

WHISTLER, R.L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, Academic Press, New York, 1964. p 28-29.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Carbohydrate chemistry for food scientist**. Saint Paul: Eagan Press, 1999. 241 p.

WHISTLER, R.L., DANIEL, J.R. Molecular structure of starch. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. **Starch: Chemistry and Technology**, 2 ed. Orlando: Academic Press, 1984. p. 153-182.

WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. Carbohidratos. In: FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 81-156.

YOO, S., JANE, J. Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 307-314, 2002.

YU, X.; HOUTMAN, C.; ATALLA, R.H. The complex of amylose and iodine. **Carbohydrate Research**, v. 292, p. 129-141, 1996.

ZENG, M. et al. Sources of variation for starch gelatinization, pasting, and gelation properties in wheat. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 63-71, 1997.

ZHEREBSTOV, N.A.; RUADZE, I.D.; YAKOVLEV, A.N. Mechanism of acid-catalyzed and enzymatic hydrolysis of starch. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 31, p. 511-514, 1995.

ZOBEL, H.F. Starch crystal transformations and their industrial importance. **Starch/Stärke**, v. 40, p. 44-50, 1988.