



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Marina Costa Garcia

Caracterização físico-química e estrutural de complexos amido-
monoestearato de glicerol em amidos de cereais e a influência
da β -ciclodextrina

São José do Rio Preto-SP
2013

Marina Costa Garcia

Caracterização físico-química e estrutural de complexos amido-
monoestearato de glicerol em amidos de cereais e a influência da
 β -ciclodextrina

Tese apresentada para obtenção do
Título de Doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos, área de Ciência
e Tecnologia de Alimentos junto ao
Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de São José do Rio
Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria
Landi Franco

São José do Rio Preto-SP
2013

Garcia, Marina Costa.

Caracterização físico-química e estrutural de complexos amido-monoestearato de glicerol em amidos de cereais e a influência da β -ciclodextrina / Marina Costa Garcia. - São José do Rio Preto, 2013.

140 f. : il.; tabs.

Orientador: Célia Maria Landi Franco

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Amidos - Indústria. 3. Beta-ciclodextrina. 4. Amilose. I. Franco, Célia Maria Landi. II. Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Marina Costa Garcia

Caracterização físico-química e estrutural de complexos amido-
monoestearato de glicerol em amidos de cereais e a influência da
 β -ciclodextrina

Tese apresentada para obtenção do
Título de Doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos, área de Ciência
e Tecnologia de Alimentos junto ao
Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de São José do Rio
Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco
UNESP - São José do Rio Preto, SP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Beatriz Rosana Cordenunsi
USP - São Paulo, SP

Prof. Dr^a Silene Bruder Silveira Sarmiento
USP - Piracicaba, SP

Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge
UNESP- São José do Rio Preto, SP

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho
UNESP - São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
11 de outubro de 2013.

Dedico este trabalho a minha família (mãe, pai e irmãos) e a Deus, os quais são essenciais na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco, pela oportunidade, dedicação e competência na orientação desse trabalho.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, apoio, carinho, ajuda nas angústias e dificuldades, e alegria nas conquistas.

Aos amigos do Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos, Raquel, Mariana, Ana Karla, Vinicius, Larissa, Thais e Jefferson pelo companheirismo, ajuda nos momentos de dificuldade da pesquisa, e acima de tudo, pela amizade construída.

A todas as amigadas que tive a oportunidade de aqui fazer, Catharina, Luana, Luiz Virgílio, Juliana, Guilherme, Gisandro, Rodolfo e Renata.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UNESP pela oportunidade, aos professores pelos ensinamentos e aos técnicos pelo apoio.

Ao Dr. Marcelo Assunção do Laboratório de Microscopia do Instituto de Física da USP, São Carlos pela parceria e dedicação para realização das análises de Microscopia de Força Atômica das amostras deste trabalho.

Ao prof. Dr. Sebastião Taboga pela paciência, orientação e dedicação para que a Análise de Microscopia de Transmissão seja realizada.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e o apoio financeiro à pesquisa.

Resumo

O efeito da β -ciclodextrina (β CD) na formação de complexos amilose-lipídios e/ou amilopectina-lipídios usando monoestearato de glicerol (GMS) (1, 2 e 3% m/m) e amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose foram estudados físico-química e estruturalmente na presença ou ausência de β -ciclodextrina (β CD) (3% m/m). Os amidos de trigo e milho normal se caracterizaram por apresentarem teores de amilose semelhantes (~ 25%) e padrão de raios-X tipo A. O amido de milho com alto teor de amilose (49,8%) apresentou padrão cristalino tipo B, enquanto o amido de milho ceroso, com padrão tipo A, teve 1,1% de amilose. O maior teor de lipídios (0,75%) e fósforo (0,05%) no amido de trigo contribuiu para sua menor temperatura de gelatinização. A adição de β CD nos amidos nativos interferiu na formação dos complexos amilose-lipídios presentes naturalmente nos amidos, de forma mais intensa no amido de trigo devido principalmente ao seu maior teor e tipo de lipídios. A adição de GMS reduziu a viscosidade de quebra e *setback* nos amidos de trigo, milho normal e milho ceroso devido à dificuldade de retrogradação das moléculas de amilose e/ou amilopectina complexadas. Após a adição da β CD, o ΔH_{cx} aumentou para os amidos de trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose, sugerindo o rompimento do complexo amilose-GMS pela β CD e associação entre β CD e GMS. Os complexos produzidos dos amidos com GMS (1, 2 e 3%) mostraram estruturas facetadas típicas de cristais quando observados em MEV e AFM, padrão cristalino tipo V e picos endotérmicos de dissociação entre a C, o que os classificou como complexos com polimorfismo IIb. Os resultados mostraram que 1% de GMS foi suficiente para complexar com as moléculas de amilose e/ou amilopectina disponíveis para complexação nos amidos de trigo, milho normal e milho ceroso, enquanto que no amido de milho com alto teor de amilose, concentrações abaixo de 3% GMS não foram suficientes para saturar toda amilose disponível para

complexação. O teor de amido resistente (AR) foi maior nos complexos formados entre os amidos de milho com alto teor de amilose, trigo e milho normal, o que os torna fonte potencial de AR. A adição de β CD na produção dos complexos provocou redução do AR e aumento do amido lentamente digerível (ALD), mas não alterou o perfil dos termogramas e dos difractogramas de raios-X apesar de ter provocado redução na cristalinidade relativa, indicando que a β CD interferiu na formação do complexo amilose-GMS e/ou amilopectina-GMS devido a uma provável interação não cristalina da β CD e GMS.

Palavras-chave: complexos de inclusão; amilose; emulsificante; β -ciclodextrina, digestibilidade.

Abstract

Effect of β -cyclodextrin (β CD) in the formation of amylose-lipid and / or amylopectin-lipids complexes using glycerol monostearate (GMS) (1, 2, 3% w/w), and wheat, normal corn, waxy corn and high amylose starches were physicochemically and structurally evaluated in the presence or absence of β -cyclodextrin (β CD) (3% w/w). Normal corn and wheat starches were characterized by similar amylose content (\sim 25%) and A-type X-ray pattern. High amylose corn starch (49.8%) presented the B-type crystalline pattern, whereas the waxy corn starch with A-type crystalline pattern had 1.1% of amylose. The higher lipid (0.75%) and phosphorus (0.05%) contents in wheat starch contributed to its lower gelatinization temperature. Addition of β CD in native starches suggested that this oligosaccharide interfered in the formation of amylose-lipid complexes naturally present in starches, more intensely in the wheat starch mainly due to their higher content and type of lipids. Addition of GMS reduced breakdown and setback in wheat, normal corn and waxy corn starches due to the retrogradation complications of the amylose and/or complexed amylopectin molecules. After the β CD addition, there was an increase of ΔH_{cx} for wheat, normal corn, and high amylose corn starches, suggesting the amylose-GMS complex disruption by β CD and a possible association between β CD and GMS. The produced complexes of starches with GMS (1, 2 and 3%) disclosed faceted structures typical of crystals when observed by SEM and AFM, V-type crystalline pattern and endothermic peaks of dissociation between 115 to 120 ° C, which classify them as IIb polymorphism. The results suggested that 1% of GMS was enough to complex with amylose and / or amylopectin molecules available for complexing in the wheat, normal corn, and waxy corn starches, whereas in the high amylose corn starch, concentrations below 3% GMS were not enough to saturate and complex all available amylose. The resistant starch (RS) content was higher in the complexes formed between the high amylose

corn, wheat and normal corn starches which make them a potential source of RS5. The addition of β CD in the synthesis of the complexes led to a significant reduction in RS and increased slowly digestible starch (SDS). It did not change the thermograms and X-ray diffractograms profile despite causing a reduction in the relative crystallinity, suggesting that β CD can interfere in the formation of the amylose-GMS and/or amylopectin-GMS complex due to a probable non-crystalline interaction among β CD and GMS.

Keywords: inclusion complexes; amylose; emulsifier; β -cyclodextrin; digestibility.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	ESTRUTURA GRANULAR	23
3.1.1	<i>Amilose</i>	23
3.1.2	<i>Amilopectina</i>	25
3.1.3	<i>Componentes menores dos grânulos de amido</i>	26
3.2	ESTRUTURA CRISTALINA	27
3.3	COMPLEXO AMIDO-LIPÍDIO	28
3.3.1	<i>Complexo amilose-lipídio</i>	29
3.3.2	<i>Complexo amilopectina-lipídio</i>	31
3.4	PREPARO DO COMPLEXO AMIDO-LIPÍDIO	32
3.5	IMPACTO DO COMPRIMENTO DA CADEIA DE AMIOSE E CARACTERÍSTICAS DOS LIPÍDIOS	34
3.6	GELATINIZAÇÃO E RETROGRADAÇÃO DO COMPLEXO AMIDO-LIPÍDIO	35
3.7	ESTRUTURA DO COMPLEXO AMIOSE-LIPÍDIO	38
3.8	FUNCIONALIDADE DOS COMPLEXOS AMIOSE-LIPÍDIOS	40
3.9	EFEITO DA β -CICLODEXTRINA NAS PROPRIEDADES DOS AMIDOS E NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO AMIOSE-LIPÍDIO	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	MATERIAL	46
4.2	MÉTODOS	46
4.2.1	<i>Caracterização dos amidos nativos</i>	46
4.2.1.1	Extração do amido de trigo	46
4.2.1.2	Composição química dos amidos	47
4.2.1.3	Microscopia eletrônica de varredura	47
4.2.1.4	Microscopia de força atômica	48
4.2.1.5	Distribuição do comprimento de cadeia ramificada da amilopectina	48
4.2.1.5.1	Desramificação dos amidos	48
4.2.1.5.2	Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	49
4.2.1.6	Afinidade por iodo e teor de amilose	49
4.2.1.6.1	Isolamento da amilopectina	49
4.2.1.6.2	Determinação do teor de amilose aparente e absoluto	50

4.2.1.7	Difração de raios-X.....	50
4.2.1.8	Amilose lixiviada.....	51
4.2.1.9	Fator de expansão e solubilidade.....	51
4.2.1.10	Propriedades de pasta.....	52
4.2.1.11	Propriedades térmicas.....	53
4.2.1.12	Sinérese de pasta.....	53
4.2.1.13	Transparência de pasta.....	53
4.2.2	<i>Estudos da adição do GMS e/ou da βCD nos amidos de cereais.....</i>	54
4.2.3	<i>Preparação dos complexos amido-emulsificante.....</i>	54
4.2.4	<i>Análise dos complexos produzidos.....</i>	54
4.2.4.1	Propriedades térmicas.....	55
4.2.4.2	Digestibilidade <i>in vitro</i>	55
4.2.5	<i>Análise estatística.....</i>	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS NATIVOS.....	57
5.1.1	<i>Composição Química.....</i>	57
5.1.2	<i>Morfologia dos grânulos.....</i>	58
5.1.3	<i>Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina.....</i>	64
5.1.4	<i>Teor de amilose.....</i>	66
5.1.5	<i>Difração de raios-X.....</i>	67
5.2	EFEITO DA ADIÇÃO DA β -CICLODEXTRINA NOS AMIDOS NATIVOS DE CEREAIS.....	69
5.2.1	<i>Amilose lixiviada.....</i>	69
5.2.2	<i>Fator de expansão e solubilidade.....</i>	71
5.2.3	<i>Propriedades de pasta.....</i>	74
5.2.4	<i>Propriedades térmicas.....</i>	76
5.2.5	<i>Sinérese de pasta.....</i>	81
5.2.6	<i>Transparência de pasta.....</i>	82
5.3	EFEITO DO MONOESTEARATO DE GLICEROL (GMS) NAS PROPRIEDADES DOS AMIDOS DE CEREAIS COM E SEM B-CICLODEXTRINA.....	84
5.3.1	<i>Amilose lixiviada.....</i>	84
5.3.2	<i>Fator de expansão e solubilidade.....</i>	88
5.3.3	<i>Propriedades de pasta.....</i>	91
5.3.4	<i>Propriedades térmicas.....</i>	98
5.3.5	<i>Sinérese.....</i>	101
5.3.6	<i>Transparência.....</i>	103
5.4	COMPLEXOS FORMADOS.....	105
5.4.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	105
5.4.2	<i>Microscopia de força atômica.....</i>	110
5.4.3	<i>Difração de raios-X.....</i>	116

5.4.4	<i>Propriedades térmicas</i>	121
5.4.5	<i>Digestibilidade in vitro</i>	126
6	CONCLUSÕES	130
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação gráfica do complexo de amilose com duas moléculas de monopalmitina mostrando a inclusão da região alifática no interior da hélice da amilose. Adaptado de Copeland et al. (2009)..... 24
- Figura 2:** Hélice de amilose complexada com um ligante, em que a cabeça polar esta localizada fora da hélice, e a cadeia alifática está no interior da hélice (CARLSON et al., 1979)..... 30
- Figura 3:** Gráfico de DSC com taxa de aquecimento de 10 °C/min de amido de batata aquecido na presença de monoglicéridios. Adaptado de Eliasson e Krong (1985)..... 36
- Figura 4:** Esquema da fusão (primeiro pico endotérmico), resfriamento (segundo pico exotérmico) e reaquecimento (pico endotérmico menor) do complexo amilose-lipídio. Adaptado de Eliasson e Krong (1985)..... 37
- Figura 5:** Estrutura toroidal da β -ciclodextrina (DE CASTRO et al., 2010)..... 43
- Figura 6:** Modelo proposto para o complexo amilose- β CD-lipídio: (a) hélices de amilose, (b) moléculas de água; (c) moléculas de β CD; (d) moléculas de monoglicéridios (TIAN et al., 2010). 45
- Figura 7:** Micrografias dos grânulos dos amidos nativos observados por MEV: A: amido de trigo; B: amido de milho normal; C: amido de milho ceroso e D: amido de milho com alto teor de amilose. 59
- Figura 8:** Imagens topográficas em 3D dos grânulos dos amidos nativos observadas por MFA: A: amido de trigo (tamanho da varredura 60 μm x 60 μm); B: amido de milho normal (tamanho da varredura 40 μm x 40 μm); C: amido de milho ceroso (tamanho da varredura 40 μm x 40 μm) e D: amido de milho com alto teor de amilose (tamanho de varredura 30 μm x 30 μm). 60
- Figura 9:** Perfil de diâmetro e altura do amido nativo de trigo, obtido a partir da imagem topográfica observada por MFA. 61
- Figura 10:** Imagens dos amidos nativos observados por MFA. (1): imagem topográfica com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (2): imagem de amplitude com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (3) imagem de contraste de fase com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm . (A): amido de trigo; (B): amido de milho normal..... 63
- Figura 11:** Imagens dos grânulos dos amidos nativos observados por MFA. (1): imagem topográfica com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (2): imagem de amplitude

com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (3) imagem de contraste de fase com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm . (C): amido de milho ceroso; (D): amido de milho com alto teor de amilose.	64
Figura 12: Perfis de distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de trigo (a), milho normal (b), milho ceroso (c), e milho com alto teor de amilose (d), obtidos por HPAEC-PAD.	65
Figura 13: Difractogramas de raios-X dos amidos de (a) milho com alto teor de amilose, (b) milho ceroso, (c) milho normal e (d) trigo.	68
Figura 14: Perfil endotérmico observado por DSC dos amidos I: trigo, II: milho normal, III Milho ceroso, IV: Milho com alto teor de amilose; (a): Amido nativo, (b) Amido com 3% de βCD . (A): 1° ciclo de aquecimento; (B): resfriamento; (C): 2° ciclo de aquecimento.	78
Figura 15: Perfil viscoamilográfico do amido de trigo adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem (a) e com 3% de βCD (b).	92
Figura 16: Perfil viscoamilográfico do amido de milho normal adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem (a) e com 3% de βCD (b).	93
Figura 17: Perfil viscoamilográfico do amido de milho ceroso adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de βCD	96
Figura 18– Perfil viscoamilográfico do amido de milho alta amilose adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de βCD	97
Figura 19: Perfil endotérmico dos amidos: I: trigo, II: milho normal, III: milho ceroso e IV: milho com alto teor de amilose adicionado de GMS sem e com βCD , (a): amido nativo, (b) 1% GMS, (c) 2% GMS, (d) 3% GMS; (e) 1% GMS e 3% de βCD , (f) 2% GMS e 3% de βCD , (g) 3% GMS e 3% de βCD . (A): 1° ciclo de aquecimento; (B): resfriamento; (C): 2° ciclo de aquecimento.	99
Figura 20: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de trigo com GMS sem e com βCD observados em MEV.	106
Figura 21: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de milho normal com GMS sem e com βCD observados em MEV.	107
Figura 22: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de milho ceroso com GMS sem e com βCD observados em MEV.	108
Figura 23: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de milho com alto teor de amilose com GMS sem e com βCD observados em MEV.	109

Figura 24: Imagens topográficas em 3D dos complexos sintetizados dos amidos de trigo e milho normal com GMS observados por MFA.....	110
Figura 25: Imagens em 3D dos complexos sintetizados dos amidos de trigo e milho normal com GMS na presença de β CD observados por MFA.	111
Figura 26: Imagem topográfica com tamanho de 2 μ m x 2,0 μ m e o perfil de rugosidade dos complexos sintetizados do amido de milho normal com 1% de GMS e 3% de β CD observados por MFA.	112
Figura 27: Imagens com tamanho de 2 μ m x 2,0 μ m dos complexos produzidos com 3% de GMS observados por MFA. A: imagem em 3D; B: imagem de fase. 1: amido de trigo; 2: amido de milho normal.	113
Figura 28: Imagens em 3D dos complexos sintetizados dos amidos com GMS observados por MFA.	114
Figura 29: Imagens topográfica em 3D dos complexos sintetizados dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose com GMS na presença de β CD observados por MFA.	115
Figura 30: Difractogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de trigo:(a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD.....	117
Figura 31: Difractogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de milho normal: (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD.....	118
Figura 32: Difractogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de milho ceroso: (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD.....	119
Figura 33: Difractogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de milho com alto teor de amilose: (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD.....	120
Figura 34: Curvas de DSC dos complexos sintetizados dos amidos de trigo (I), milho normal (II), milho ceroso (III), milho com alto teor de amilose (IV), com (a) 1% GMS; (b), 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD. A: 1o ciclo de aquecimento; B: resfriamento; C: 2o ciclo de aquecimento.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros fornecidos no laudo de qualidade dos amidos de milho comercial fornecidos pela Cargill.....	47
Tabela 2 - Composição química do amido de trigo e dos amidos de milho com diferentes níveis de amilose (% em relação a matéria seca) ¹	57
Tabela 3 - Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose.	65
Tabela 4 - Afinidades por iodo ¹ e teores de amilose ¹ aparente e absoluto dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose.....	66
Tabela 5 - Porcentagem de amilose lixiviada ¹ dos amidos de trigo, milho normal, ceroso e com alto teor de amilose adicionados ou não de 3% de β CD em diferentes temperaturas.....	69
Tabela 6 - Fator de expansão ¹ (FE) em diferentes temperaturas e solubilidade ¹ (S) a 80°C dos amidos de cereais adicionados ou não de 3% de β CD.....	72
Tabela 7 - Propriedades de pasta ¹ de amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados ou não de 3% de β CD.	74
Tabela 8 - Sinérese dos géis ¹ dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, adicionados ou não de 3% de β CD e refrigerados por 10 dias. .	82
Tabela 9 - Transparência ¹ dos géis dos amidos de cereais adicionados ou não de 3% de β CD, refrigerados por 0 e 10 dias.....	83
Tabela 10 - Teor de amilose lixiviada, em diferentes temperaturas, dos amidos de trigo e milho normal adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.	84
Tabela 11 - Teor de amilose lixiviada, em diferentes temperaturas, dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.	87
Tabela 12 - Fator de expansão ¹ em diferentes temperaturas e solubilidade ¹ a 80°C dos amidos de trigo e milho normal adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.....	88
Tabela 13 - Fator de expansão ¹ em diferentes temperaturas e solubilidade ¹ a 80°C do amido de milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.	90

Tabela 14 - Sinérese dos géis dos amidos de cereais adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD, refrigerados por 10 dias.	102
Tabela 15 - Transparência ¹ dos géis de amido de trigo, adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD, refrigerados por 0 e 10 dias.....	104
Tabela 16 - Conteúdo de ARD, ALD e AR ¹ dos amidos nativos e seus respectivos complexos sintetizados de amido de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose com 1% de GMS sem e com 3% de β CD.	127

LISTA DE ABREVIATURAS

ALD: Amido lentamente digerível

ARD: Amido rapidamente digerível

AR: Amido resistente

B.S: Bse seca

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSC: Calorímetro diferencial de varredura

FE: Fator de expansão

GMS: Monoestearato de glicerol

HPAEC-PAD: Cromatografia de troca iônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico

LFL: Lisofosfolípido

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MFA: Microscopia de força atômica

RPM: Rotações por minuto

S: Solubilidade

T: Trasmitância

βCD: β-ciclodextrina

ΔH: Entalpia

1 INTRODUÇÃO

O grânulo de amido consiste de resíduos de α -D-glicose, sendo uma mistura heterogênea de dois homopolímeros, amilose e amilopectina, que se apresentam em proporções de aproximadamente 25:75, respectivamente. No entanto, existem algumas variedades de vegetais geneticamente modificadas que produzem essencialmente amidos com 100% de amilopectina são denominados de amido ceroso e outras que produzem amidos com mais de 50% de amilose são os amidos com alto teor de amilose. A amilose e a amilopectina compõem 98-99% do peso seco do grânulo de amido, sendo o restante composto por componentes menores como lipídios, proteínas, minerais, e fósforo.

Amidos e lipídios são componentes importantes dos alimentos. Estes constituintes são capazes de interagir e formar complexos de inclusão amido-lipídios e alterar as propriedades funcionais nos sistemas de alimentos. A amilose tem habilidade de formar complexos com uma variedade de ligantes, enquanto a amilopectina possui uma habilidade limitada para formar complexos, pois somente as cadeias ramificadas mais longas são capazes de formar hélices. Na presença de uma molécula hospedeira a amilose adota uma configuração de hélice simples que é estabilizada por pontes de hidrogênio. A parte de fora da hélice é hidrofílica, enquanto a parte interna é hidrofóbica e por isso adequada para acomodar moléculas hospedeiras lipofílicas.

Os complexos de inclusão formados principalmente com a amilose podem modificar as propriedades e funcionalidades dos amidos, por exemplo, reduzindo a solubilidade em água, retardando a retrogradação e resistindo à hidrólise enzimática produzindo um novo amido resistente ou amido lentamente digerível. Mudanças na funcionalidade dos amidos são de grande interesse da indústria alimentícia e da nutrição humana e por isso os complexos amido-lipídios têm sido estudados extensivamente usando vários métodos.

O monoestearato de glicerol (GMS) é um dos emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos, principalmente em produtos de panificação, devido a sua estrutura anfifílica. Alguns estudos têm relatado a influência deste emulsificante nas propriedades físico-químicas, morfológicas e reológicas dos amidos e, portanto, sua influência direta nas propriedades dos produtos finais à base de amido. Quando os complexos amilose-emulsificantes são formados, as moléculas de emulsificantes no interior da hélice de amilose contribuem para sua estabilidade, impedindo que a amilose se retrograde e, assim, retarda o envelhecimento dos produtos de panificação.

A β -ciclodextrina (β CD) por ser um oligossacarídeo cíclico com núcleo hidrofóbico,

também, pode formar complexos de inclusão com várias moléculas orgânicas e inorgânicas, como por exemplo, moléculas de lipídios. Em amidos, a β CD modifica suas propriedades físico-químicas. A β CD pode ser utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Em alimentos ela pode ser utilizada para incorporar componentes pouco solúveis em água, remover colesterol do creme de leite fresco e ovos, mascarar ou reduzir sabores indesejáveis, proteger contra decomposições induzidas por luz e melhorar as propriedades de gelatinização de amidos.

A capacidade da β CD de romper os complexos amido-lipídio naturais dos amidos de cereais para se complexar com os lipídios tem sido estudada. Tian et al. (2010) relataram que a interação β CD com o complexo amilose-lipídio ocorreu no amido de arroz retrogradado, sendo que esta interação primeiramente destruiu a formação do complexo amilose-lipídio e competiu com a amilose para formar o complexo de inclusão β CD-lipídio e, posteriormente, a β CD interagiu diretamente com a amilose para formar o complexo amilose- β CD-lipídio. A formação do complexo amilose- β CD-lipídio causou desordem da conformação das moléculas de amido, resultando em atraso na taxa de retrogradação do amido de arroz.

Neste trabalho, a caracterização *in vitro* e estrutural de complexos amido-lipídio formados entre amidos de cereais com diferentes teores de amilose e monoacilglicerol (GMS) foi estudada na presença ou ausência de β CD.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da β -ciclodextrina (β CD) na formação de complexos amilose-lipídios e/ou amilopectina-lipídios usando monoestearato de glicerol (GMS) e amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, e nas propriedades físico-químicas desses amidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as características estruturais e físico-químicas dos amidos nativos de cereais.

Verificar o efeito da adição de β CD nas propriedades físico-químicas dos amidos de cereais.

Avaliar o efeito da adição do GMS na presença ou ausência de β CD nas propriedades físico-químicas dos amidos de cereais.

Sintetizar e estudar as características estruturais e as propriedades funcionais dos complexos de amido com GMS na presença ou ausência de β CD.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESTRUTURA GRANULAR

Os grânulos de amido estão densamente empacotados em estruturas semicristalinas, sendo, portanto, insolúveis em água a temperatura ambiente (JANE, 2006). A estrutura cristalina organizada pode ser observada por microscopia. Sob luz polarizada, os grânulos exibem a Cruz de Malta, conferindo uma alta ordem cristalina em seu interior, cujo índice de refração varia dependendo da direção em que o raio de luz passa pela molécula. Em amidos com alto teor de amilose, não é possível observar o fenômeno de birrefringência, característica esta associada à amilopectina, no entanto, no caso deste amido, as hélices de amilose contribuem para sua cristalinidade (RIDOUT et al., 2002; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Os grânulos de amido possuem uma estrutura organizada que pode ser observada por microscopia. Múltiplas camadas concêntricas de diâmetro crescente, chamado de anéis de crescimento, estendem-se do ponto central (hilo) em direção à superfície do grânulo. Os anéis de crescimento concêntricos compreendem regiões cristalinas e amorfas intercaladas, de maior e menor densidade, respectivamente. Os anéis de crescimento representam o crescimento periódico do grânulo a partir da biossíntese do amido (BULÉON et al., 1998). As regiões de maior densidade possuem estrutura lamelar com camadas cristalinas e amorfas alternadas. Nas lamelas, as camadas cristalinas são formadas principalmente por cadeias de amilopectina empacotadas em estrutura cristalina, enquanto, as camadas amorfas contêm pontos de ramificação da amilopectina e moléculas de amilose e amilopectina em uma conformação desordenada (COPELAND et al., 2009; JANE, 2007).

3.1.1 Amilose

A amilose é um polímero essencialmente linear formado por unidades de D-glicose ligadas em α - (1 \rightarrow 4), com poucas ligações em α -(1-6). Possui grau de polimerização (GP) e peso molecular variável de acordo com a origem botânica e estágio de maturação (BULÉON et al. 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Segundo Jane (2006), a amilose é comumente encontrada entremeada e entrelaçada com a amilopectina, mas pode também estar separada da amilopectina e se apresentar em feixes. No entanto, quando estão juntas é a amilose que mantém as moléculas de amilopectina unidas durante uma transição térmica, mantendo com isso a integridade dos grânulos de amido.

A amilose se apresenta na forma de hélice. Os grupos hidroxilas estão localizados na superfície externa da hélice, enquanto, a superfície interna é revestida por grupos metileno e oxigênios glicosídicos, resultando em uma cavidade hidrofóbica, podendo formar complexos com uma variedade de ligantes orgânicos e inorgânicos, como, álcool linear e lipídios. A amilose está associada às regiões amorfas nos grânulos de amidos normais, no entanto, em amidos com alto teor de amilose, esse polímero pode se empacotar em duplas hélices formando uma estrutura cristalina (TESTER, 1997; TESTER; KARKALAS; QI, 2004; COPELAND et al., 2009).

Nos grânulos de amidos normais, as moléculas de amilose e amilopectina encontram-se entrelaçadas, mas também podem estar separadas e a amilose apresentar-se na forma de feixe. Portanto, quando estão juntas, a amilose mantém as moléculas de amilopectina juntas durante a transição térmica e, conseqüentemente, mantém a integridade do grânulo de amido (JANE et al., 1986; JANE, 2006). Os amidos cerosos não possuem a amilose para entrelaçar, portanto, exibem uma estrutura pouco empacotada na periferia do grânulo, conseqüentemente, dispersam com mais facilidade (JANE, 2007).

A amilose co-cristalizada com compostos como iodo, álcoois e ácidos graxos é denominada amilose-V (BULÉON et al. 1998). Quando complexada com iodo, a amilose apresenta coloração azul, portanto métodos colorimétricos podem ser empregados na sua determinação (COPELAND et al., 2009).

Em amidos de cereais a amilose pode estar presente no grânulo de amido nativo de duas maneiras principais: como amilose livre de lipídios ou na forma de complexos amilose-lipídio. A Figura 1 mostra a região alifática do ácido graxo, formando um núcleo hidrofóbico no interior da hélice de amilose (conformação V) (BULÉON et al., 1998). Esses complexos podem afetar as propriedades estruturais e tecnológicas dos grânulos de amidos (TESTER, 1997; COPELAND et al., 2009).

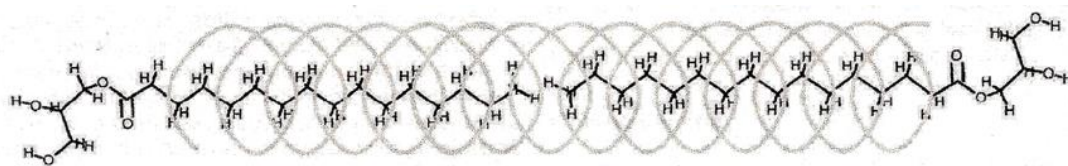


Figura 1: Representação gráfica do complexo de amilose com duas moléculas de monopalmitina mostrando a inclusão da região alifática no interior da hélice da amilose. Adaptado de Copeland et al. (2009).

3.1.2 Amilopectina

A amilopectina é uma molécula muito maior que a amilose, altamente ramificada, possuindo as mesmas ligações D-glicosídicas α - (1 \rightarrow 4) que a amilose, além de ligações D-glicosídicas α - (1 \rightarrow 6), as quais são responsáveis pela ligação das cadeias ramificadas. A amilopectina apresenta coloração avermelhada na presença de iodo e é estável em soluções aquosas diluídas (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Vários modelos propostos para explicar a arquitetura da amilopectina são baseados na identificação de três diferentes cadeias de D-glicose, cadeias A, B e C. French (1974) e Robin et al. (1974) propuseram um modelo de “cluster” para a amilopectina, em que a cadeia principal C, carrega a única extremidade redutora desse polissacarídeo, e, numerosas ramificações, denominadas cadeias A e B que formam duplas hélices. As cadeias mais periféricas, que não carregam nenhuma ramificação, são chamadas de cadeias A. As cadeias B são ramificadas, apresentando uma ou mais cadeias A ou B ligadas a elas. As cadeias B podem ser classificadas como B₁-B₄ dependendo do número de “clusters” em que a cadeia toma parte (HIZUKURI et al. 1997; TESTER, 1997; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). As cadeias A são unidas nas cadeias B por ligações α -(1-6), e, cada “cluster” pode ser ligado a outro pela cadeia B ou pela cadeia principal C. As cadeias de amilopectina nos “clusters” formam duplas hélices que são estabilizadas por ligações de hidrogênio intermoleculares. Quando essas duplas hélices se empacotam de forma ordenada formam lamelas cristalinas concêntricas, que são intercaladas com material amorfo formado por regiões de ramificações α -(1-6) (TESTER, 1997; TESTER; KARKALAS; QI, 2004; COPELAND et al., 2009).

Acredita-se que as lamelas cristalinas consistam de “clusters” formados pelas duplas hélices das cadeias laterais da amilopectina, alternados com lamelas amorfas formadas pelas regiões de ramificação da amilopectina. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das lamelas cristalinas indicam que as regiões entre os “clusters” sejam de natureza amorfa, portanto, a lamela cristalina não é contínua (BULÉON et al., 1998; GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram um novo modelo de “clusters” para a amilopectina e uma estrutura lamelar para o grânulo de amido. Esses autores sugeriram que as lamelas amorfas e cristalinas da amilopectina são organizadas em estruturas maiores, mais ou menos esféricas, denominadas de bloquetes. O diâmetro desses bloquetes depende da fonte botânica do amido e da sua localização no grânulo.

A amilopectina se encontra predominantemente na conformação de dupla hélice na camada semicristalina, no entanto, sua cristalinidade é reduzida, possivelmente devido ao aumento da sua interação com a amilose. Essa camada é formada pelos bloquetes de menor tamanho indicando menor organização cristalina (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

3.1.3 Componentes menores dos grânulos de amido

Os componentes menores relacionados com o amido correspondem a três categorias; material particulado composto principalmente por fragmentos da parede celular; componentes da superfície como proteínas e enzimas, e, os componentes internos. Os lipídios e o fósforo representam os mais importantes componentes internos dos grânulos de amido, sendo característico dos amidos de cereais (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Os amidos de cereais apresentam teores de lipídios que podem variar de 0,8 a 1,2 e de 0,6 a 0,8% para amidos de trigo e milho, respectivamente, os quais não podem ser extraídos com facilidade. Como consequência, parte dos lipídios permanece nos amidos de cereais, sendo responsáveis pela fixação de cor, desenvolvimento de aromas e formação de complexos (BULÉON et al., 1998).

Os lipídios presentes nos amidos de cereais diferem em quantidade e tipo. Os ácidos graxos linoléico (18:2) e palmítico (16:0) são os principais componentes na maioria dos cereais, mas há traços de ácidos graxos livres (AGL) e lisofosfolipídios (LFL). Estes lipídios estão em quantidades positivamente correlacionadas ao teor de amilose dos amidos de cereais. Amidos de trigo, cevada e arroz contêm aproximadamente 80% de LFL, enquanto outros cereais contêm principalmente AGL e uma quantidade mínima de LFL (MORRISON, 1988; BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Os LFL são tenso-ativos anfifílicos gerados naturalmente em membranas biológicas pela ação da fosfolipase e são encontrados na maioria dos tecidos biológicos. A molécula de LFL possui um grupo de cabeça polar e um grupo acil de cadeia longa ligado a um glicerol. O grupo de cabeça polar consiste de uma hidroxila livre na cadeia de glicerol e uma porção aniônica ligada à cadeia de glicerol via éster de fosfato (STAFFORD; DENNIS, 1988).

3.2 ESTRUTURA CRISTALINA

As cadeias de amilopectina com mais de 10 unidades de glicose são organizadas em duplas hélices, que estão arranjadas em duas formas cristalinas, A e B, que podem ser identificadas através de padrões de raios-X. As estruturas de dupla hélice das formas cristalinas A e B, são essencialmente as mesmas (COPELAND et al., 2009), mas o empacotamento das hélices de amilopectina do tipo A é mais compacto e possui cadeias de amilopectina menores que o do tipo B, que possui uma estrutura mais aberta e o centro mais hidratado (JANE, 2006).

A forma polimórfica do tipo C é provavelmente uma mistura dos tipos A e B em diversas proporções, podendo ser classificada como C_A , C_B e C_C de acordo com sua proximidade com os polimorfismos tipo A ou B (BULÉON et al., 1998; TESTER, 1997).

O padrão A é característico de amidos de cereais, enquanto o padrão B é característico de amidos de tubérculos, raízes, frutas, milho com alto teor de amilose e de amidos retrogradados, e o padrão C de amidos de leguminosas (TESTER, 1997; BULÉON et al., 1998; COPELAND et al., 2009). Os amidos com padrões dos tipos A e B diferem em suas características estruturais e funcionais sendo que a amilopectina dos amidos com padrão tipo A possui mais cadeias curtas e poucas cadeias médias e longas do que a amilopectina do tipo B (AO; JANE, 2007; SALMAN et al., 2009).

O padrão de raios-X da amilose complexada com compostos orgânicos ou iodo é do tipo V. Diferentemente dos tipos A e B, o tipo V pode existir na forma anidra (V_a) e hidratada (V_h). Amilose-V é um termo genérico usado para as moléculas de amilose obtidas como hélices simples co-cristalizadas com compostos como iodo, álcoois ou ácidos graxos. Apesar de tais compostos serem necessários para a formação da estrutura tipo-V, eles não estão sistematicamente incluídos na hélice de amilose. No caso de complexos amilose-lipídio, a parte alifática do lipídio está incluída no interior da hélice de amilose, enquanto o grupo polar permanece fora da hélice por ser muito volumoso. No tipo- V_h , a forma mais comum obtida pela complexação de amilose com lipídios, as hélices simples empacotam em célula unitária ortorrômbica ($a=1,37\text{nm}$, $b=2,37\text{nm}$, $c=0,805\text{nm}$) com grupo espacial $P2_12_12_1$ e 16 moléculas de água por célula unitária (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

3.3 COMPLEXO AMIDO-LIPÍDIO

Os complexos amido-lipídios podem ser encontrados naturalmente nos alimentos ou formados durante a gelatinização do amido na presença de lipídios e/ou emulsificantes. Esses complexos existem em duas formas: complexos amilose-lipídios amorfos ou tipo I e complexos cristalinos ou tipo II (BILIADERIS; GALLOWAY, 1989; TUFVESSON; WAHLGREN; ELIASSON, 2003). O complexo cristalino (tipo II) exhibe uma maior temperatura de fusão que o complexo amorfo (tipo I) (TESTES; MORRISON, 1990; CUI; OATES, 1999).

A complexação ocorre principalmente entre amilose e lipídios. Poucas moléculas de amilopectina tem capacidade de formar complexos do “tipo V”, devido a impedimentos estéricos e ao curto comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina (CONDE-PETIT; ESCHER; NUESSELI, 2006). O tipo de lipídio tem capacidade de influenciar na complexação com amilose e/ou amilopectina. Os lipídios são amplamente definidos como um grupo de compostos que são solúveis em solventes orgânicos. Eles podem ser divididos em três grupos: lipídios simples como os monoglicerídios, diglicerídios e triglicerídios, os lipídios compostos como os fosfolipídios, e os lipídios derivados como os ácidos graxos livres e álcoois de cadeia longa (DUNCAN, 2000).

As propriedades dos complexos “tipo V” formado por amilose com diferentes GP (20, 60, 400 e 950) têm sido bem relatadas (GELDERS et al., 2005; GELDERS; GOESAERT; DELCOUR, 2006). Amidos pré-tratados com enzimas desramificantes para estudar a habilidade de complexação com lipídios também têm sido estudados (HASJIM et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Amidos gelatinizados têm sido extensivamente usados na investigação dos complexos amilose tipo V, porque podem fornecer amilose lixiviada suficiente para complexação com lipídios (PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010). Além disso, amidos tratados por solventes orgânicos (GOHEN et al., 2008) ou por *annealing* (NAKAZAWA; WANG, 2004) para remover lipídios endógenos, também têm sido relatados para melhorar o grau de complexação.

Tang e Copeland (2007) investigaram o grau de formação do complexo entre amilose e ácidos graxos e sua influência na gelatinização do amido de trigo e nas suas propriedades reológicas, e os resultados indicaram que o processo foi dependente do tipo e quantidade de ácidos graxos. No entanto, os dados não foram suficientes para permitir um completo entendimento das características da formação dos complexos, pois a formação dos complexos e suas propriedades físicas e químicas são afetadas por muitos fatores, tais como os tipos de

amido e lipídios envolvidos, condições de gelatinização e tratamento térmico, e o método de adição dos lipídios (CHANG; HE; HUANG, 2013b; EXARHOPOULOS; RAPHAELIDES, 2012; MIRA; PERSSON; VILLWOCK, 2007; TUFVESSON; ELIASSON, 2000).

3.3.1 Complexo amilose-lipídio

A amilose tem habilidade de formar complexos com uma variedade de ligantes, dentre eles os lipídios e outros compostos hospedeiros, como o iodo que fornece uma cor azul (PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010). Nos grânulos de amido, as cadeias de amilose exibem uma curva natural em uma conformação helicoidal com seis unidades de glicose por volta (ZOBEL, 1988).

A amilose dos amidos de cereais possui a capacidade de complexar com lipídios endógenos. Nos grânulos de amido nativos esses complexos estão no estado amorfo, mas sua cristalização se torna possível com aquecimento do amido com água (LE BAIL et al., 1999; MORRISON; LAW; SNAPE, 1993). A complexação a partir dos compostos adicionados requer que a amilose esteja acessível e possua mobilidade suficiente para sofrer as mudanças conformacionais (CONDE-PETIT; ESCHER; NUESSELI 2006).

A formação dos complexos é afetada pelos tipos de lipídios e amidos envolvidos, e, pelas condições em que o complexo é formado. Lipídios polares, como monoglicerídeos, ácidos graxos e compostos similares, formam um complexo de inclusão entre a cadeia de hidrocarboneto do lipídio e a hélice da amilose (KARKALAS et al., 1995; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010). A molécula de amilose forma uma hélice composta de três voltas ao redor da cadeia hidrocarbonada do lipídio polar. A porção hidrofóbica do lipídio fica inserida no interior da hélice, enquanto os grupos hidroxilas estão localizados fora da hélice (Figura 2). Portanto, os grupos hidrofóbicos dos agentes complexantes entram na hélice de amilose e são estabilizados pela ligação de van der Waals com os carbonos da molécula de amilose (GODET et al., 1993). O grupo carboxila dos ácidos graxos e o glicerol dos monoacilglicerídios não entram na cavidade hidrofóbica da hélice, devido a impedimentos estéricos e repulsões eletrostáticas. Portanto, a força que direciona a formação do complexo é de natureza hidrofóbica (CARLSON et al., 1979; SNAPE et al., 1998; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010).

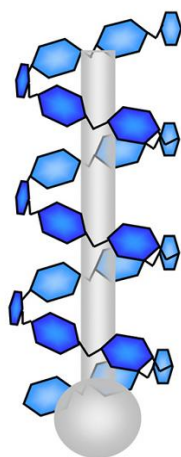


Figura 2: Hélice de amilose complexada com um ligante, em que a cabeça polar está localizada fora da hélice, e a cadeia alifática está no interior da hélice (CARLSON et al., 1979).

Os complexos de amilose podem ser classificados de acordo com o tamanho da hélice que corresponde ao número de monômeros de glicose por volta na hélice, e no empacotamento das hélices simples de amilose tipo V no estado cristalino. O diâmetro interno da hélice é controlado pelo tamanho do agente complexante, resultando em hélices com 6 (lipídios, álcoois lineares), 7 (compostos alquil de cadeias ramificadas) ou 8 (compostos mais volumosos) resíduos de glicose por volta, o que depende do ligante ser volumoso ou ramificado (GODET et al., 1993; IMMEL; LICHTENTHALER, 2000; NISHIYAMA et al., 2010; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010; RAPPENECKER; ZUGENMAIER, 1981; RUTSCHMANN; SOLMS, 1990). A formação do complexo é um processo molecular favorecido pela alta concentração dos monômeros de amido (amilose) e lipídio, sendo que para cada molécula de lipídio são necessários de 18 a 24 unidades de glicose para a formação do complexo (ELIASSON, 1994).

As propriedades dos complexos formados com moléculas de amilose com diferentes grau de polimerização (GP) (20, 60, 400 e 950) têm sido relatadas (GELDERS et al., 2005; GELDERS; GOESAERT; DELCOUR, 2006). Lagendijk e Pennings (1970) usando frações de amilose e monopalmitato de glicerol (GMP) relataram que uma cadeia longa de amilose (com GP de 900) pode conter de 10 a 12 hélices, e cada hélice pode estar ligada a pelo menos uma molécula de GMP. A partir desse estudo, Godet et al. (1996) sugeriram que para a formação do complexo, a molécula de amilose deve ter um comprimento suficiente para acomodar duas moléculas de ácidos graxos, por exemplo, para complexação do ácido palmítico seriam

necessários de 30 a 40 resíduos de glicose, enquanto que para o ácido láurico, 20 a 30 unidades de glicose seriam suficientes.

Estudos calorimétricos (DSC) mostram que a formação do complexo é instantânea e reversível. A fusão do complexo amilose-lipídio é visto como um pico endotérmico, e, durante o resfriamento, o complexo é reformado apresentando um pico exotérmico (JANE, 2006). A necessidade de aquecer e dissociar o complexo entre amilose e seus ligantes sugere que existem forças que estabilizam a conformação da hélice. Ligações intramoleculares como as forças de *Van der Waals* e as pontes de hidrogênio ocorrem em volta da hélice e estabilizam a hélice de cadeia simples (KARKALAS et al., 1995; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010). As forças intermoleculares, por outro lado, estabilizam as interações entre a amilose e o ligante (IMMEL; LICHTENTHALER, 2000; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010).

A partir de estudos das propriedades térmicas de misturas de ácido graxo e amido de batata gelatinizado, Kawai et al. (2012) relataram que o complexo amido-lipídio com maior temperatura de dissociação apresentou maior comprimento helicoidal, refletindo em uma maior estabilidade física. Enquanto que a entalpia do complexo correspondeu à quantidade de complexo e ao grau da ordem cristalina dentro do complexo. Segundo Eliasson e Krong (1985), a relação da entalpia com o grau de ordem cristalina é menor do que com a quantidade de complexo amido-lipídio.

Cui e Oates (1999) ao avaliarem a interação entre lipídios com diferentes comprimentos de cadeia carbônica e amido de sago, na formação de complexos amilose-lipídios, relataram que a entalpia do complexo diminui com o aumento do comprimento da cadeia do monoglicerídio, pois menores moléculas de monoglicerídios são mais bem acomodadas dentro da hélice da amilose.

3.3.2 Complexo amilopectina-lipídio

A capacidade de complexação da amilopectina com lipídios é muito pequena em relação à amilose, devido ao alto grau de ramificações das moléculas de amilopectina (COPELAND et al., 2009), e poucos estudos tem sido encontrados (ELIASSON, 1994; MIRA, PERSON; VILLWOCK, 2007; VILLWOCK et al., 1999).

Os pontos de formação do complexo amilopectina-lipídio se localizam nas cadeias ramificadas da molécula de amilopectina. Se o comprimento mínimo de cadeia para a formação de um complexo amilose-lipídio é de 18 unidades de glicose, e, o grau de polimerização médio para as cadeias de cereais cerosos é de 23-24 unidades de glicose, certamente há a possibilidade

do complexo amilopectina-lipídio ocorrer (ELIASSON, 1998; VILLWOCK et al., 1999).

Evidências diretas da formação do complexo amilopectina-lipídio são difíceis de serem comprovadas, mas dados indiretos a partir do DSC indicam que os complexos amilopectina-lipídio são formados durante a gelatinização (ELIASSON, 1994). Estudos realizados por Gudmundsson e Eliasson (1990), com uma mistura de amido de milho ceroso e emulsificantes, observaram curvas de DSC com transição térmica acima de 100 °C, indicando a formação do complexo amilopectina-lipídio. Isso foi confirmado pela cristalinidade tipo “V” obtida pela difração de raios-X. Mira, Person, Villwock (2007) demonstraram que os complexos de amilopectina-lipídios, também, são formados, mas a presença de um agente emulsificante com carga é um fator que parece desempenhar um papel favorável na formação de complexos no caso de amidos cerosos.

3.4 PREPARO DO COMPLEXO AMIDO-LIPÍDIO

Segundo Putseys, Lamberts e Delcour (2010) existem três métodos para obtenção do complexo de inclusão amilose-lipídio: (I) a partir do amido e ligantes, (II) a partir da amilose e ligantes, e, (III) amilose sintetizada na presença de lipídios, sendo que os complexos formados usando os métodos II e III são mais puros e monodispersos.

Em situações experimentais o complexo é facilmente formado: quando uma dispersão adequada de lipídios é adicionada em uma solução de amilose o complexo precipita, e pode ser coletado por centrifugação para posteriores estudos (ELIASSON, 1998; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010).

A complexação da amilose com lipídios ocorre durante a gelatinização do amido. As cadeias de amilose precisam de maior mobilidade para interagir com os ligantes (EVANS, 1986), enquanto, os lipídios devem estar na fase líquido cristalino (KRONG, 1981).

Na formação dos complexos mais puros, o amido é solubilizado em DMSO quente e depois solubilizado em água quente, e, então a solução é equilibrada na temperatura desejada, em que, o ligante dissolvido em solução alcoólica quente será adicionado. Esta mistura é mantida aquecida por um determinado tempo, e, em seguida deixada resfriar lentamente para a precipitação do complexo (GALLOWAY; BILIADERIS; STANLEY, 1989; JANE; ROBYT, 1984; PUTSEYS et al, 2010).

Tang e Copeland (2007) avaliaram o efeito da funcionalidade dos complexos entre amido de trigo e ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia carbônica na presença de instauração ou não, e relataram que a formação do complexo é influenciada pela solubilidade do lipídio e a concentração micelar crítica. Isto significa que a faixa de concentração para o máximo de formação de complexos entre amidos e lipídios varia dependendo do tipo de lipídio e sua solubilidade em água. Estes autores ainda observaram que os complexos entre amido e lipídios, com baixa solubilidade em água quando observados em difratômetro de raio-X acima de certa concentração de lipídio, tendem se auto associar ao invés de formar complexos. Estes autores relataram também que altas concentrações de emulsificantes mais solúveis em água não reduzem a sua capacidade de complexação. No caso deste estudo, o ácido caprílico e o ácido láurico possuem maior solubilidade que o ácido palmítico e esteárico e, portanto, o aumento da concentração dos ácidos caprílico e láurico não reduziram a complexação com a amilose.

Para preparação de complexos amido-lipídios, dois métodos de adição dos lipídios têm sido recentemente estudados, adição do ácido graxo após o aquecimento do sistema de amido (método I) e adição de ácidos graxos antes do aquecimento do sistema de amido (método II). Exarhopoulos e Raphaelides (2012) empregaram os dois métodos de adição de ácidos graxos ao sistema de amido e relataram que o modo de adição influencia as características morfológicas e estruturais dos complexos amido-lipídios, pois as amostras aquecidas após adição de ácidos graxos exibiram maiores cristalinidades, o que pode ser atribuído que a complexação na superfície dos grânulos foi mais organizada, principalmente a temperaturas em que os grânulos incham, mas que não foram rompidos.

Chang, He e Huang (2013b) avaliaram a influência dos métodos de adição de ácido graxo e da temperatura de incubação na localização do complexo V-amilose, e na digestibilidade do complexo de amido de milho-ácido láurico, e relataram que a adição do ácido láurico antes do aquecimento, pode inibir a desintegração do grânulo de amido, pois forma o complexo na superfície do mesmo retardando o transporte de água dentro do grânulo e a lixiviação da amilose. O modo de adição do ácido graxo no sistema de amido após aquecimento (método I), ou antes, do aquecimento (método II) da mistura de amido, apresentou papel importante nas propriedades estruturais e funcionais do complexo V-amilose. Os resultados indicaram que a presença de ácido láurico retardaria a gelatinização do amido. Os complexos V-amilose preparados pela adição do ácido láurico após aquecimento da mistura de amido foi formado em todo grânulo, enquanto que o complexo V-amilose preparado pela

adição do ácido láurico antes do aquecimento foi formado principalmente na superfície no grânulo. O método I foi favorável à formação do complexo V-amilose e retardou a hidrólise do amido, que tem um potencial de aplicação na indústria de alimentos.

3.5 IMPACTO DO COMPRIMENTO DA CADEIA DE AMILOSE E CARACTERÍSTICAS DOS LIPÍDIOS

A formação dos complexos depende do comprimento das cadeias de amilose e dos lipídios, grau de insaturação dos lipídios e do equilíbrio entre as regiões amorfas e helicoidais da amilose, bem como da natureza iônica dos surfactantes. Com base na mudança da parte ativa da molécula e equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HBL), a habilidade de interação de diferentes surfactantes é diferente. Surfactantes com baixo valor HBL têm um efeito menor do que aqueles com valores mais elevados. O valor do HBL, portanto, representa o tamanho e a força dos grupos hidrofílicos e lipofílicos de uma molécula de emulsificante, e, podem influenciar a capacidade de complexação (ELIASSON, 2004).

A temperatura de fusão, estabilidade, tamanho cristalino e o nível de organização, dos complexos amido-lipídios aumentam com o comprimento da cadeia de amilose (GELDERS et al., 2004; GODET et al., 1996). No entanto, as cadeias de amilose não podem ser muito longas e nem muito curtas, provocando, assim, defeitos cristalinos. De acordo com Godet, Bizot e Buléon (1995), as cadeias de amilose com GP de 20 são muito pequenas para formar complexos com lipídios, enquanto, Gelders et al. (2004) observaram que a molécula de amilose com GP de 60, não pode ser arranjada em um complexo amilose-lipídio tipo II.

O comprimento mínimo da cadeia de amilose necessário para formar complexo, é determinado pelo comprimento da cadeia do lipídio (PUTSEYS et al., 2009). Quanto maior a cadeia de lipídio, maior deve ser a cadeia de amilose, com isso mais forte a interação entre amilose-lipídio. No entanto, quanto maior a cadeia do lipídio, maior sua hidrofobicidade e menor a solubilidade em água, assim, maior a tendência de entrar no interior da hélice da amilose (GELDERS et al., 2004; WHITTAM et al., 1989). Pesquisas têm mostrado que a temperatura de dissociação do complexo amido-lipídio aumenta com o comprimento da cadeia alifática da molécula de lipídio, devido à menor hidrofobicidade dos lipídios de cadeias muito longas (GELDERS; GOESAERT; DELCOUR, 2006; PUTSEYS et al., 2009).

A presença de ligações duplas, também, exerce forte influência nas propriedades dos complexos. Quanto maior o grau de insaturação do lipídio menor a estabilidade térmica do complexo amilose-lipídio (ELIASSON; KRONG, 1985; KARKALAS et al., 1995; PUTSEYS et al., 2009). A máxima complexação com os lipídios ocorre a diferentes concentrações por diferentes lipídios, dependendo da sua solubilidade em água e sua concentração micelar crítica. A concentração micelar crítica (a primeira agregação micelar que ocorre), diminui para os ácidos graxos com maiores comprimento de cadeias, diminuindo a solubilidade em água (TANG; COPELAND, 2007).

Karkalas et al. (1995) e Putseys et al. (2009) sugeriram que a estrutura não linear de um lipídio com ligações duplas *cis* torna a inserção do lipídio na cavidade linear da hélice mais difícil. No entanto, os átomos de carbono adjacentes da molécula de lipídio são capazes de girar livremente para a dupla hélice, levando a uma dupla hélice com estrutura mais linear. Isto implica que a complexação ainda pode acontecer, mas o entrelaçamento da hélice é necessário, necessitando de mais que o usual de seis unidades de glicose por volta.

3.6 GELATINIZAÇÃO E RETROGRADAÇÃO DO COMPLEXO AMIDO-LIPÍDIO

O processo de gelatinização ocorre quando o amido é aquecido na presença de água, as regiões amorfas dos grânulos são desestabilizadas pela absorção de água e inchamento do grânulo, e as regiões cristalinas (que consistem principalmente de duplas hélices da amilopectina) se desdobram com o aumento do nível de hidratação (JACOBS et al., 1998). Os grânulos de amido são destruídos como consequência do processo de gelatinização, e a amilose é lixiviada para fora do grânulo. Quando na presença de emulsificante ou ácido graxo como monoglicerídeo, a amilose lixiviada forma um complexo de inclusão helicoidal com os emulsificantes ou ácidos graxos. Monoacilglicerídios induziriam a formação de complexos de amilose-lipídio durante gelatinização, limitando o inchamento, a dispersão dos grânulos de amido e a solubilização da amilose, gerando, desta forma, pastas opacas com viscosidade reduzida e maiores temperaturas de pasta (BULÉON et al., 1998).

A formação do complexo amido-lipídio ocorre apenas após os grânulos de amido comecarem a inchar, pois, a partir desse ponto, a mobilidade das moléculas de amilose aumenta rapidamente, devido a sua lixiviação para fora do grânulo (KEETELS et al., 1996). No entanto, é suposto que os lipídios também podem formar complexos com moléculas que ainda estão

presentes nos grânulos inchados, pois os lipídios são moléculas pequenas o bastante para se difundir dentro do grânulo inchado (KEETELS et al., 1996; RAPHAELIDES; GEORGIADIS, 2007).

Os termogramas obtidos por DSC registram a dissociação do complexo amido-lipídio mostrando uma endoterma de transição que ocorre a temperaturas mais altas que as temperaturas de gelatinização do amido. A temperatura de transição do complexo depende do conteúdo de água e do tipo de lipídio complexado (KEETELS et al., 1996). A formação do complexo de inclusão de amilose é um processo exergônico e resulta na diminuição da entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}) e aumento da temperatura de gelatinização do amido complexado devido à formação do complexo amido-lipídio (ELIASSON, 1986; RAPHAELIDES; GEORGIADIS, 2007).

O gráfico de DSC do amido aquecido na presença de lipídios pode ser observado na Figura 3, mostrando o aquecimento do amido de batata (livre de lipídios) com ácido mirístico e ácido palmítico. O primeiro pico corresponde a fusão dos cristais de monoglicerídios, sendo Ia o ácido láurico e Ib o ácido mirístico. O segundo pico é referente à gelatinização do amido, o terceiro pico corresponde à transição do complexo amilose-lipídio e o quarto pico pode ser devido à transição entre as fases cristalina-líquida dos lipídios (ELIASSON, 1994).

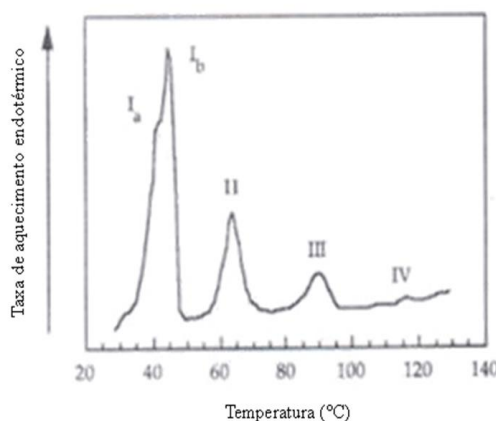


Figura 3: Gráfico de DSC com taxa de aquecimento de 10 °C/min de amido de batata aquecido na presença de monoglicerídios. Adaptado de Eliasson e Krong (1985).

A transição térmica do complexo amilose-lipídio durante a sequência de aquecimento-resfriamento-reaquecimento pode ser observada na Figura 4. Esses eventos não estão totalmente entendidos, mas sabe-se que envolve a fusão da estrutura cristalina complexa, e, da dissociação da amilose e lipídio. No resfriamento, o complexo é formado novamente e ocorre à

recristalização, sendo um pico exotérmico a menor temperatura, e, normalmente mais forte em relação ao pico de fusão (BULPIN; WELSH; MORRIS, 1982; RAPHAELIDES; GEORGIADIS, 2007).

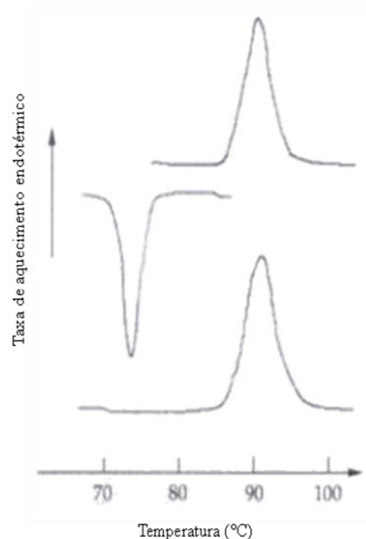


Figura 4: Esquema da fusão (primeiro pico endotérmico), resfriamento (segundo pico exotérmico) e reaquecimento (pico endotérmico menor) do complexo amilose-lipídio. Adaptado de Eliasson e Krong (1985).

A presença de moléculas de emulsificantes retarda a gelatinização e retrogradação dos amidos (TUFVESSON et al., 2001), reduz digestibilidade *in vivo* (HOLM et al., 1983) e *in vitro* (CROWE; SELIGMAN; COPELAND, 2000). As propriedades reológicas dos amidos gelatinizados (MIRA; PERSSON; VILLWOCK, 2007) e a cristalinidade dos complexos estão relacionada à temperatura de aquecimento, quanto maior a temperatura maior a cristalinidade (EXARHOPOULOS; RAPHAELIDES, 2012).

O termo retrogradação é usado para descrever as mudanças que ocorrem durante o resfriamento e armazenamento do amido gelatinizado. A amilose apresenta uma maior tendência a retrogradação do que a amilopectina, que retrograda em longo prazo (THOMAS; ATWELL, 1999). Quando os emulsificantes são adicionados ao amido ou a formulação de um produto que contém amido, a entalpia de retrogradação (ΔH_r) diminui, e esta influência que os lipídios polares exercem sobre a retrogradação do amido tem sido explicada pela formação do complexo amilose-lipídio (ELIASSON, 1998). A quantidade e a composição dos lipídios influenciam a retrogradação do amido (PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010).

Além dos emulsificantes retardarem o envelhecimento de produtos à base de amido via complexação com a amilose, também, exercem um importante papel na redução da lixiviação

das moléculas de amilose e amilopectina para fora do grânulo minimizando desta forma o inchamento do grânulo e, possivelmente, reduzindo a taxa de retrogradação da amilopectina por meio do inchamento parcial dos grânulos de amido (STAUFFER, 1990; PUTSEYS; LAMBERTS; DELCOUR, 2010).

3.7 ESTRUTURA DO COMPLEXO AMILOSE-LIPÍDIO

A formação do complexo entre amilose e lipídios é, sob condições adequadas, seguida por cristalização. Sob temperaturas de complexação baixas (< 60 °C), forma-se o complexo amilose-lipídio do “tipo I” ou “tipo amorfo”, o qual apresenta baixa temperatura de dissociação (< 100 °C). Ao contrário, alta temperatura de complexação (> 90 °C) produz um complexo amilose-lipídio do tipo “semicristalino” ou “tipo II” (GELDERS et al., 2004). Os complexos são organizados em lamelas empacotadas em tamanho de submicrons de esferoides que formam agregados de tamanho microscópico. Ácidos graxos saturados formam estrutura mais cristalina dentro da lamela do que os insaturados (ELIASSON, 1985; ZABAR et al., 2009).

Tufvesson e Eliasson (2000) usaram o DSC para analisar as temperaturas de transição e entalpia de fusão e determinar a quantidade de complexos entre o amido de batata e o monopalmitato de glicerol, e relataram que o complexo tipo I apresentou temperatura de fusão menor que o tipo II, mesmo quando ambos os complexos foram pré-aquecidos. Uma distinção baseada no grau de cristalinidade é feita entre complexos amilose-lipídio do tipo IIa e IIb. Complexos do tipo IIb têm uma temperatura de fusão mais alta que do tipo IIa, mas ambos acima de 100 °C (SENEVIRATNE; BILIADERIS, 1991). As temperaturas de dissociação são dependentes também do comprimento da cadeia do ácido graxo e de seu grau de insaturação (ELIASSON, 1994; SNAPE et al., 1998; GELDERS et al., 2004).

O complexo do tipo II apresentou a conformação V, mas o tipo I não. Isto indicou que o tipo II era mais cristalino que o tipo I. O padrão cristalino tipo V medido a partir do padrão de raios-X tem sido extensivamente descrito na literatura (BILIADERIS; GALLOWAY, 1989; BIAIS et al., 2006; LESMES et al., 2009; TANG; COPELAND, 2007). Difratogramas de complexos amido-lipídios tipo V apresentam picos a 7°, 13°, 20°, sendo classificados em tipo II (BILIADERIS; GALLOWAY, 1989; KARKALAS et al., 1995; LESMES et al., 2009).

Biliaderis e Galloway (1989) e Karkalas et al. (1995) sugeriram que o polimorfismo tipo IIa indica hélices com uma estrutura supermolecular com menores registros cristalográficos,

uma organização mais compacta e menores temperaturas de dissociação (~105 °C), enquanto o tipo IIb são estruturas de cristais bem definidos com maiores temperaturas de dissociação (~116 °C). As diferenças entre os polimorfismos IIa e IIb podem ser facilmente atribuídas às diferenças no tamanho e perfeição dos cristais formados.

O pré-tratamento de desramificação do amido pode formar complexos com mais eficiência do que as moléculas de amido nativo, pois aumenta a quantidade de longas cadeias lineares para complexar. Hasjim et al. (2010) avaliaram as propriedades físico-químicas de um novo modelo de amido resistente produzido pela complexação de amido com alto teor de amilose desramificado e relataram que o complexo amido-lipídio apresentou maior temperatura de dissociação e foi mais resistente a hidrólise enzimática. Tufvesson e Eliasson (2000) e Tufvesson, Wahlgren e Eliasson (2003) encontraram que a taxa e a extensão da α -amilólise na amilose complexada com monoestearato foram inversamente relacionadas ao grau de organização: complexos com maior cristalinidade foram mais resistentes à degradação enzimática.

Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) dos complexos amilose-ácidos graxos revelaram uma disposição uniaxial das moléculas de amilose que foram interrompidas por segmentos amorfs com espessura de até 4,6 nm (GODET et al., 1996). Richardson et al. (2004) investigaram estruturas de complexos de amilose de batata com GMS a partir de imagens de TEM e relataram filamentos esféricos formando uma rede, com comprimentos de até 2000 nm e diâmetro de 200-300 nm.

Trabalhos de microscopia de força atômica (MFA) têm mostrado que o complexo amilose-V também exibe agregados de cristais compreendidos de pequenos esferulitos de ~50-100 nm, lamela com poucos microns de comprimentos e espessura de ~10 nm, e também exibe outras estruturas mal definidas (LESMESS et al., 2009). Zabar et al. (2010) avaliaram as características estruturais de complexos de amilose de batata com ácidos graxos saturado e insaturado a partir de imagens de MEV e MFA e relataram a natureza dos agregados amilose-lipídios e as mudanças que ocorrem na morfologia das partículas de amilose durante a complexação. As imagens de MEV mostraram grandes cristais de complexos, com espessura de aproximadamente 1 μ m, embebidos em uma matriz, e que as interações da amilose com ácidos graxos levaram a formação de complexos de inclusão organizados em lamelas empacotadas na forma de esferoides que tendem a se agregar. Esta mudança também foi notada pelo aumento da rugosidade média da superfície das partículas de amilose obtidas por imagens em MFA. Esses autores relataram, também, que o aumento da instauração dos ácidos graxos leva a

formação de complexos mal definidos, e diminui sua termoestabilidade. Lesmes et al. (2009) e Zabar et al. (2009) produziram complexos de amilose de batata e ácidos graxos saturados e insaturados por DMSO, e relataram a partir de imagens obtidas em MEV que os complexos apresentaram menores cristais facetados em relação aos complexos produzidos por acidificação. Lalush et al. (2005) relataram que o tipo de método utilizado na produção de complexos com ácidos graxos de cadeias longas afeta a organização estrutural do complexo resultando em morfologias esféricas ou lamelares.

Exarhopoulos e Raphaelides (2012) investigaram o efeito do teor de amilose, comprimento da cadeia do ácido graxo e tipo de aquecimento para preparação do complexo amido-ácido graxo, e relataram a partir de imagens de MEV e de microscopia ótica, que com a adição do ácido graxo antes do aquecimento da solução de amido, quanto maior era o comprimento da cadeia do ácido graxo, maior quantidade de grânulos que permaneceram intactos. Com o aumento da temperatura de preparação do complexo o padrão de cristalinidade tipo V prevaleceu em todos os amidos independentes do tipo de ácido graxo presente. Tanto a temperatura de aquecimento quanto o modo de adição do ácido graxo nos sistemas de amido, isto é, antes ou após aquecimento da dispersão de amido à temperatura especificada, foram fatores que influenciaram o grau de cristalinidade. A cristalinidade dos complexos foi maior que as das amostras controle devido à formação do complexo amilose-lipídio.

3.8 FUNCIONALIDADE DOS COMPLEXOS AMILOSE-LIPÍDIOS

Em sistemas alimentícios, os complexos amilose-lipídios formados com monoglicerídios, ácidos graxos livres, lisofosfolipídios ou surfactantes modificam as propriedades funcionais dos produtos finais (KARKALAS et al., 1995). Por exemplo, nos produtos amiláceos, os lipídios são usados como emulsificante ou modificadores de massa para retardar o envelhecimento dos pães, como demonstrado por Krong e Jensen (1970). A complexação amido-lipídio reduz a susceptibilidade da amilose ao ataque enzimático, previne a lixiviação desta molécula durante a gelatinização, inibe o inchamento do grânulo, reduz a solubilidade do amido em água, altera as propriedades reológicas de pasta, e, retarda a retrogradação. Portanto, influenciam diretamente na textura, digestibilidade e aceitabilidade dos alimentos à base de amido pelos consumidores (EXARHOPOULOS; RAPHAELIDES, 2012; RADHIKA; MOORTHY, 2008; SALMAN; COPELAND, 2010).

Zhang et al. (2012) avaliaram a influência do tempo de desramificação do amido de milho com alto teor de amilose e sua complexação com ácido láurico nas propriedades estruturais e digestibilidade *in vitro*, e relataram que a formação do complexo reduziu a digestibilidade do amido pela competição com a retrogradação da amilose. Portanto, a complexação com lipídios retarda o processo de envelhecimento de produtos alimentícios amiláceos.

O amido resistente pode ser classificado em cinco tipos: AR1, AR2, AR3, AR4 e AR5. O tipo 1 inclui o amido inacessível fisicamente, o tipo 2 é representado pelos grânulos de amido nativo resistente, o tipo 3 refere-se ao amido retrogradado, o tipo 4 aos amidos modificados quimicamente e o tipo 5 aos amidos complexados com lipídios. O AR5 foi definido por Fuentes-Zaragoza et al. (2011) como um polissacarídeo constituído de unidades de glicose unidas por α -1,4 linear, insolúvel em água, e que não é susceptível a degradação enzimática. Eles também relataram que esses polissacarídeos promovem a formação de ácidos graxos de cadeia curta, em particular o butirato, no cólon, e são assim adequados para o uso como suplemento nutricional para a prevenção de doenças colorretais. Portanto, um novo tipo de amido resistente (AR 5) tem sido desenvolvido por meio do processamento de amidos com ácidos graxos e emulsificantes.

Hasjim et al. (2010) produziram um novo amido resistente a partir do amido de milho com alto teor de amilose desramificado com isoamilase e complexado com ácido palmítico. A formação do complexo amilose-lipídio afeta a suscetibilidade enzimática em dois sentidos: diminui o inchamento do grânulo e assim a enzima tem menos oportunidade para ganhar acesso ao interior do grânulo; e os complexos amilose-lipídios são mais resistentes às enzimas digestivas do que a amilose livre. Esses autores produziram pães com formulações diferentes, o pão adicionado de AR5, obtido a partir da complexação do amido de milho com alto teor de amilose e o ácido palmítico, e o pão branco controle, sem adição de AR5, e analisaram a concentração de glicose (glicose pós-prandial) e insulina plasmática em humanos após ingestão do produto. Foi observado que o pico máximo de glicose plasmática pós-prandial e de resposta à insulina para o pão contendo amido resistente foi reduzido pela metade comparado ao pão branco controle.

3.9 EFEITO DA β -CICLODEXTRINA NAS PROPRIEDADES DOS AMIDOS E NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO AMILOSE-LIPÍDIO

As ciclodextrinas compõem uma série de oligossacarídeos cíclicos, formados por unidades de D-glicose unidas por ligações α (1 \rightarrow 4). O exterior da molécula é hidrofílico devido ao grande número de grupos hidroxilas, ao passo que o interior da cavidade é essencialmente hidrofóbico por conta do “revestimento” de carbono com grandes quantidades de oxigênio dos resíduos de 15 glicoses. Essa estrutura possibilita que as ciclodextrinas abriguem em seu interior moléculas hidrofóbicas (ZHOU et al., 2012).

Tratando-se amido com amilase derivada de *Bacillus macerans*, obtém-se uma mistura bruta composta por aproximadamente 60% de α -ciclodextrina (seis unidades de glicose), 20% de β -ciclodextrina (sete unidades de glicose) e 20% de γ -ciclodextrina (oito unidades de glicose), juntamente com uma pequena quantidade de ciclodextrinas contendo mais de oito unidades de glicose. Avanços biotecnológicos possibilitaram uma purificação mais eficiente dessa mistura, já que frequentemente, ao se tentar purificar amostras como essas, obtinham-se dextrina lineares, proteínas e outras impurezas. A partir da década de 1970, a engenharia genética passou a utilizar CGTases, enzimas mais específicas para a produção das α -, β - e γ -ciclodextrinas do que as utilizadas anteriormente. A partir desses métodos mais refinados, foi possível obter um rendimento mais expressivo destes oligossacarídeos (SICARD; SANIEZ, 1987; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

As ciclodextrinas formam complexos de inclusão, nos quais moléculas de água localizadas dentro da cavidade lipofílica central são substituídas por outra molécula, também lipofílica. Entretanto, os grupos hidroxila localizados externamente à molécula são capazes de formar ligações de hidrogênio com outras moléculas, capacitando a molécula a formar complexos solúveis em água com compostos lipofílicos não solúveis em água (LOFTSON; DUCHÊNE, 2007). Esses oligossacarídeos são utilizados para aumentar a solubilidade de medicamentos insolúveis em água através do processo de formação de complexos de inclusão. Além do aumento da solubilidade, a formação desses complexos contribui para o aprimoramento da biodisponibilidade desses compostos, redução de efeitos colaterais, aumento da estabilidade, entre outros (GEORGE; VASUDEVAN, 2012).

As ciclodextrinas são produtos resultantes da hidrólise enzimática de amidos, apresentando grupos hidroxilas primários e secundários, nas aberturas de sua estrutura toroidal tri-dimensional ou de bobina (Figura 5), que contém, normalmente, seis (α), sete (β) e oito (γ)

unidades de glicose, respectivamente, que são unidas por ligações α -(1-4) (LINDNER; SAENGER, 1982). Devido ao seu arranjo espacial, o exterior da bobina é muito mais hidrofílico do que o interior, resultando em uma capacidade de formar complexos de inclusão com outras substâncias hidrofóbicas, transmitindo simultaneamente a solubilidade em água a todo sistema (DE CASTRO et al., 2010; FRACETTO et al., 2007).

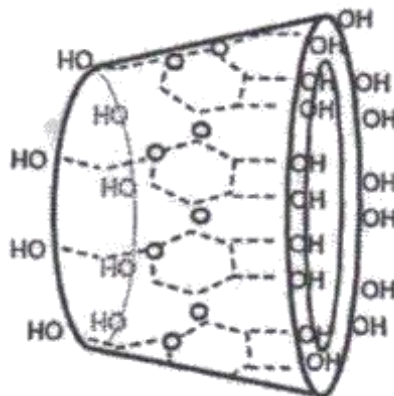


Figura 5: Estrutura toroidal da β -ciclodextrina (DE CASTRO et al., 2010).

A β -ciclodextrina pode ser utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Em alimentos, pode ser utilizada para incorporar componentes pouco solúveis em água (LOFTSSON; DUCHENE, 2007), remover colesterol do creme de leite fresco e ovos (SHIM; AHM; KWAK, 2003), mascarar ou reduzir sabores indesejáveis, proteger contra decomposições induzidas por luz (SZENTE; SZEJTLI, 2004) e melhorar as propriedades de gelatinização de amidos (KIM; HILL, 1984; GUNARATNE; CORKE, 2007), estendendo assim, a vida de prateleira dos produtos.

Entre as ciclodextrinas, a β CD é a mais usada na indústria para a formação de complexos de inclusão, devido a facilidade de produção, pois ela é mais estável e menos solúvel em água, sendo assim mais fácil sua separação das outras ciclodextrinas. Também seu rendimento a partir de amido é maior que o das outras ciclodextrinas (BONILHA, et al., 2006). As CDs são normalmente vendidas como um pó fino e cristalino, o qual permanece estável por um longo tempo (BIWER; ANTRANIKIAN; HEINZLE, 2002).

Segundo Szente e Szejtli (2004), compostos de sabor complexados com β CD apresentam resistência considerável no que diz respeito à sorção de umidade e aglomeração no armazenamento em ambiente com umidade elevada. Outro exemplo de utilização da β CD é na preparação de emulsões água em óleo, como maionese e molhos para salada: devido à sua

estrutura, a β CD é capaz de estabilizar esse tipo de emulsão. Componentes que dão cor ao ketchup, por exemplo, podem se estabilizar com a adição de 0,2% de β CD. Com isso, o aquecimento no processamento não descolore o produto. Além disso, pode-se adicionar β CD em sucos em pó para evitar escurecimento, já que este produto contém açúcares e aminoácidos, e aglomeração das partículas.

Ratnasooriya e Rupasinghe (2012) utilizaram a β CD para extrair compostos fenólicos bioativos do bagaço de uva. Os resultados de seus estudos indicaram que há um potencial na aplicação da β CD no pré-tratamento do suco de uva, de modo a aprimorar estes compostos fenólicos bioativos. Além disso, há um potencial para o uso na recuperação de compostos fenólicos de subprodutos provenientes de frutas processadas para a produção de compostos bioativos em pó, podendo ser utilizados posteriormente para agregar valor aos alimentos. Outro uso da β CD se encontra no nicho dos aditivos alimentares. Gomes et al. (2013), através de métodos instrumentais de avaliação de cor em iogurtes, constataram que complexos de inclusão formados com a β CD e os pigmentos provenientes de pimentão vermelho da espécie 17 *Capsicum annuum* demonstraram mais estabilidade na cor do que quando utilizado o extrato cru de pimentão vermelho.

Em amidos, a β CD modifica suas propriedades físico-químicas. Kim e Hill (1984) constataram que a β CD aumentou significativamente o poder de inchamento, solubilidade, amilose lixiviada e viscosidade do amido de trigo, proporcionalmente à ruptura dos complexos amilose-lipídio. Quando a β CD está complexada, ela é menos solúvel e mais estável. No entanto, Li, Huang e Corke (2000) relataram redução da viscosidade do amido de trigo com adição da α -amilase, na presença da β CD, mas, aumentou a viscosidade de pico para farinha de trigo nas mesmas condições, sugerindo que a β CD tem forte influência na inibição da α -amilase no endosperma do trigo.

Gunaratne e Corke (2007) avaliaram a influência da β CD e da hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β CD) nas propriedades funcionais de amidos de trigo, arroz e batata, e do complexo amilose-lipídio nos amidos de cereais, e, relataram que ambas a β CD e HP β CD provocaram um aumento do poder de inchamento, solubilidade, amilose lixiviada e uma redução na entalpia de gelatinização dos amidos nativos e dos complexos, além de provocar a ruptura do complexo amilose-lipídio pela complexação da ciclodextrina com os lipídios, produzindo um novo complexo lipídio-ciclodextrina-amilose. Esses autores relataram que o efeito da β CD é mais pronunciado no segundo estágio da gelatinização do amido.

Tian et al. (2009) ao estudarem a influência da β CD e do monoestearato de glicerol (GMS) nas propriedades físico-químicas de amido de arroz, observaram que as características de retrogradação deste amido foram modificadas tanto pela β CD quanto pelo monoestearato de glicerol (GMS), sendo que a redução na taxa de retrogradação foi maior quando β CD foi usada. Este efeito foi atribuído à interação da β CD com a amilose, sendo possível a observação do complexo amilose- β CD nas curvas obtidas por Calorimetria Diferencial de Varredura.

Em outro estudo, Tian et al. (2010) relataram que a interação β CD com o complexo amilose-lipídio ocorreu no amido retrogradado, sendo que esta interação primeiramente destruiu a formação do complexo amilose-lipídio e competiu com a amilose para formar o complexo de inclusão β CD-lipídio e, posteriormente, a β CD interagiu diretamente com a amilose para formar o complexo amilose- β CD-lipídio (Figura 6). A formação do complexo amilose- β CD-lipídio causou desordem da conformação das moléculas de amido, resultando no atraso na taxa de retrogradação do amido.

Zhan, Tian e Tong (2013) avaliaram amido de arroz modificado pela presença da β CD e constataram que a β CD pode interagir com o amido de modo a obter um maior rendimento de amido lentamente digerível. Segundo esses autores, a baixa digestibilidade se dá pela formação de complexos de não-inclusão entre a β CD e o amido, este complexo apresentou baixa resistência a enzima. Além disso, esses complexos são mais úteis para melhorar o rendimento do amido de baixa digestibilidade (ALD) do que o complexo amido-lipídio.

Poucos estudos estão disponíveis na literatura sobre o efeito da β CD nas interações amido-lipídios e nas propriedades físico-químicas de amidos, os quais apresentam muitas vezes resultados contraditórios, justificando assim a necessidade de mais estudos sobre o assunto.

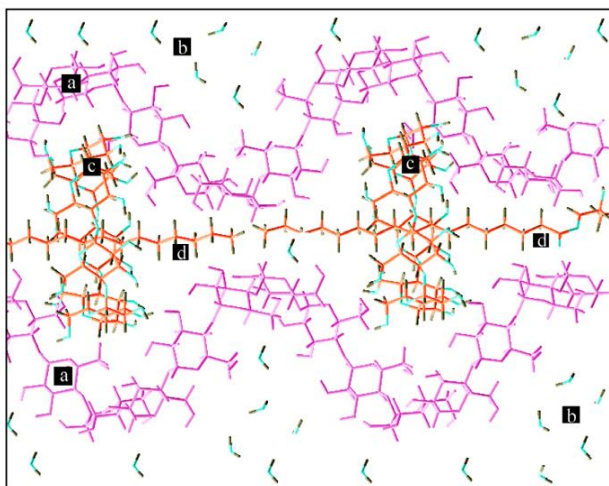


Figura 6: Modelo proposto para o complexo amilose- β CD-lipídio: (a) hélices de amilose, (b) moléculas de água; (c) moléculas de β CD; (d) moléculas de monoglicerídios (TIAN et al., 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram amidos comerciais de milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, denominados Amilogill 2100, Amido de milho “waxy” e AmyloGel 03003, respectivamente. Estes amidos foram gentilmente fornecidos pela Cargill Agrícola S/A (São Paulo, Brasil), e os grãos de trigo *Triticum aestivum L.*, fornecidos pelo Moinho Regis (Goiânia, GO) para extração do amido em laboratório.

O emulsificante monoestearato de glicerol (GMS) foi obtido da Alfa Aesar Jonhson Mtthey Company (Massachusetts, EUA), e a β -ciclodextrina (β CD) foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Todos os reagentes utilizados foram puros para análise.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização dos amidos nativos

4.2.1.1 Extração do amido de trigo

O amido de trigo foi isolado segundo metodologia descrita por Raeker et al. (1998). Os grãos de trigo foram macerados em HCL 0,02 M na proporção de 10 mL.g⁻¹ de grão por 18 h a 4° C para amolecimento da casca, e posteriormente neutralizados com NaOH 0,2 M.

Os grãos foram moídos com água na proporção de 1:1 (v:v), num liquidificador industrial de aço inox com capacidade para 4 L. O tempo de moagem foi de 20 s. A mistura foi filtrada em peneira de nylon com 105 μ m de diâmetro com auxílio de vácuo e a fração retida na peneira foi triturada novamente para garantir maior rendimento de amido. Em seguida, o filtrado foi passado através de peneira de nylon com 65 μ m de diâmetro, com auxílio de vácuo para remoção das fibras. O amido presente no filtrado foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 10 min.

O amido precipitado foi ressuspendido em água destilada e centrifugado a 3000 x g por 10 min para separar a camada de amido (inferior) da camada de proteína (superior) de coloração verde/marrom, que foi removida com auxílio de espátula. O procedimento para separação da proteína foi repetido três vezes. Em seguida, o amido foi purificado com solução de tolueno: NaCl 0,2 M na proporção de 1:5, sob agitação forte durante 30 min (em capela). Após a agitação, a mistura permaneceu em repouso por 1 h para decantação do amido e

suspensão da proteína. A proteína foi retirada por sucção e descartada. O procedimento para purificação do amido foi repetido mais duas vezes para garantir total remoção da proteína.

O amido desproteínizado foi novamente ressuspensionado em água destilada e centrifugado a 3000 x g por 10 min. Este procedimento foi realizado até remoção total da solução tolueno: NaCl. Em seguida, o amido desproteínizado foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 12 h.

Amidos de milho

Os amidos comerciais de milho normal, milho ceroso e de milho com alto teor de amilose foram fornecidos pela Cargill Agrícola S/A com as especificações apresentadas no laudo de qualidade conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros fornecidos no laudo de qualidade dos amidos de milho comercial fornecidos pela Cargill.

Amido	Umidade (%)	Proteína (%)	Análises microbiológicas
Amilogill2100 (normal)	11,55	0,36	Ausente
Waxy (ceroso)	11,10	0,40	Ausente
AmyloGel 03003(alta amilose)	10,50	0,33	Ausente

4.2.1.2 Composição química dos amidos

Os teores de umidade, lipídios, proteínas, cinzas e fibras foram determinados de acordo com os Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC) (2000). O teor de fósforo foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Smith e Caruso (1964). O teor de carboidratos foi determinado por diferença. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos amidos nativos foi realizada usando um Microscópio Eletrônico de Varredura, (modelo DSM 960 ZEISS - "Digital Scanning Microscope"). Uma pequena quantidade de amostra, previamente desidratada com etanol absoluto, foi colocada sobre uma fita adesiva de carbono aderida a um disco metálico, o qual foi conduzido a um metalizador (modelo SCD 050, Balzers, Liechtenstein) para aplicação de

uma camada de 20 nm de ouro. As amostras assim preparadas foram observadas no microscópio eletrônico de varredura e imagens com aumentos de 2000 vezes foram obtidas.

4.2.1.4 Microscopia de força atômica

A análise de microscopia de força atômica (MFA) foi realizada no Laboratório de Microscopia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo – USP, campus de São Carlos-SP, utilizando um microscópio de força atômica (marca Bruker, modelo Icon, Santa Barbara-CA, USA). O suporte de mica foi preparado a partir da dissolução com acetona da porção de cola presente em “fita mágica” transparente da marca 3M. Aliquotas dos amidos nativos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose em suspensão (5 mg/mL) foram depositadas sobre o suporte de mica previamente preparada e secas à temperatura ambiente. Em seguida, a mica contendo a amostra foi colocada no microscópio e, em contato intermitente com o cantilever de silício retangular com constantes de mola 40 N.m^{-1} e frequência de operação de 330 KHz, as imagens foram capturadas. As imagens topográficas em 3D, de fase e de amplitude, e as medidas de diâmetro e altura dos grânulos de amidos foram obtidas e editadas a partir do software NanoScope Analysis próprio do microscópio de força atômica.

4.2.1.5 Distribuição do comprimento de cadeia ramificada da amilopectina

4.2.1.5.1 Desramificação dos amidos

Os amidos foram inicialmente desengordurados conforme descrito por Jane e Chen (1992), com modificações. Amostras de 50 mg de amido foram dispersas em 5 mL de DMSO 90% e mantidas em banho de água fervente durante 1 h com agitação, e por mais 16 h à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de amido foi misturada a 2 mL de etanol absoluto e o amido precipitado foi recuperado por centrifugação a $12000 \times g$ por 10 min.

As amostras desengorduradas foram desramificadas utilizando enzima isoamilase (EC 3.2.1.68) obtida de *Pseudomonas sp.*, da marca Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Irlanda), seguindo o procedimento descrito por Wong e Jane (1995), com modificações. A 5 mg de amido desengordurado foram adicionados 1,8 mL de água ultra pura (18 M Ω .cm) e as amostras foram mantidas em banho de água fervente por 30 min com agitação. Após resfriamento, 0,2 mL de tampão acetato 0,1 M pH 3,5, 6 μL de solução de azida 10% (m/v) e 3 μL de isoamilase (Megazyme, 3 U), foram adicionados e a suspensão foi incubada a 40 °C por 16 h sob agitação de 100 rpm. Após este período, o pH foi ajustado para 6,5 - 7,0 com NaOH

1M e a suspensão foi colocada em banho de água fervente por 15 min, para inativação da enzima. Após atingirem a temperatura ambiente as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22 µm.

4.2.1.5.2 Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

A distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos foi analisada por cromatografia de troca iônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) (ICS 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA) equipado com amostrador automático AS40.

Amostras (20µL) preparadas como descrito anteriormente foram automaticamente injetadas no sistema HPAEC-PAD constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-100 (250x4 mm), em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-100. A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes potenciais de pulso e durações: E₁ = 0,10 V (t₁ = 0,40 s); E₂ = -2,00 V (t₂ = 0,02 s); E₃ = 0,60 V (t₃ = 0,01 s); E₄ = -0,10 V (t₄ = 0,06 s). A fase móvel utilizada para a separação era constituída pelo eluente A (150 mM NaOH) e eluente B (500 mM acetato de sódio e 150 mM NaOH) com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e temperatura de 40°C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificados com N₂. O gradiente utilizado foi: 0-15 min, gradiente linear de 28 a 40% de eluente B; e 15-95 min, gradiente linear terminando com 72% de eluente B. Uma mistura de maltodextrinas (DP 1-7), contendo diferentes concentrações (31, 42, 23, 42, 39, 33 e 48 µg.mL⁻¹, respectivamente) de cada açúcar, foi utilizada para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

4.2.1.6 Afinidade por iodo e teor de amilose

4.2.1.6.1 Isolamento da amilopectina

As amilopectinas dos amidos nativos foram isoladas conforme método de Jane e Chen (1992) com modificações. Amostras de 1 g de amido foram dispersas em 100 mL de DMSO 90% em banho de água fervente por 1 h e por mais 16 h à temperatura ambiente. O amido foi precipitado em 200 mL de etanol anidro e centrifugado a 12000 x g por 15 min. O precipitado foi ressuspenso em 200 mL de água deionizada quente, o pH foi ajustado para 5,9-6,3, utilizando tampão fosfato (16,4% de KH₂PO₄ e 3,6% K₂HPO₄).

A suspensão foi colocada em banho de água fervente com refluxo por 1 h adicionada de 15-20% de n-butanol. Essa mistura foi deixada em refluxo por mais 30 min e então transferida para uma garrafa térmica pré-aquecida onde foi lentamente resfriada por 36 h. O complexo amilose-butanol formado foi separado por centrifugação a 12000 x g por 15 min.

O sobrenadante foi evaporado até metade do volume inicial em rotoevaporador e colocado novamente em refluxo. Essa etapa foi repetida até que não se observasse mais precipitado de amilose.

A amilopectina foi precipitada com adição de metanol e recuperada por centrifugação a 1200 x g, por 10 min. Em seguida, foi lavada duas vezes com etanol anidro, recuperada por filtração a vácuo, e, seca em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C por 24 h.

4.2.1.6.2 Determinação do teor de amilose aparente e absoluto

Os amidos nativos foram previamente desengordurados conforme descrito por Jane e Chen (1992) com modificações, como descrito no item 4.2.1.5.1. As afinidades por iodo (AI) dos amidos desengordurados e das amilopectinas isoladas foram determinadas usando um autotitulado potenciométrico (716 DMS Titrimo, Metrohm, Suíça). Os teores de amilose aparente e absoluto foram determinados usando a metodologia descrita por Schoch (1964) com modificações por Kasemsuwan et al. (1995). Todas as determinações foram realizadas, no mínimo, em triplicata. O teor de amilose aparente foi calculado segundo a Equação 1, e para o teor de amilose absoluto foi utilizada a Equação 2:

$$AM_{ap} = 100 \times AI_A / 20\% \quad (1)$$

$$AM_{abs} = 100 \times (AI_A - AI_{AP}) / (20\% - AI_{AP}) \quad (2)$$

Onde,

AM_{ap} = teor de amilose aparente

AM_{abs} = teor de amilose absoluta

AI_A = afinidade por iodo do amido integral

AI_{AP} = afinidade por iodo da amilopectina isolada

20% = afinidade por iodo da amilose pura (TAKEDA; HIZUKURI, 1987).

4.2.1.7 Difração de raios-X

As umidades dos amidos nativos foram equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25 °C, aw = 0,9) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X, foram

determinados em difrattômetro de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação de Cu, linha K, $L = 1,542 \text{ \AA}$. A velocidade de varredura foi de 2° por minuto e as condições de uso foram 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente calculada baseando-se na relação entre a área dos picos e área total dos difrattogramas, conforme método descrito por Nara e Komiya (1983), utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA), e, os difrattogramas foram suavizados utilizando a ferramenta 'Smooth'.

4.2.1.8 Amilose lixiviada

O teor de amilose lixiviada dos amidos nativos foi determinado segundo método descrito por Palav e Seetharaman (2006). Amostras de 20 mg (b.s.) dos amidos foram pesadas, e 10 mL de água destilada foi adicionados. Os tubos foram aquecidos a diferentes temperaturas (65, 75, 85 e 95 °C) por 30 min. Em seguida, foram resfriados à temperatura ambiente, e centrifugados a $2000 \times g$ por 10 min. Uma alíquota (0,05 mL) do sobrenadante foi tratada com 0,25 mL de solução de iodo (0,2% KI e 0,02% I_2). A cor azul foi quantificada após 20 min a 630 nm usando microleitora de absorvância. O cálculo de amilose lixiviada foi realizado a partir da leitura da absorvância, utilizando equação da reta da curva padrão de amilose pura de batata (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) de concentração conhecida.

4.2.1.9 Fator de expansão e solubilidade

A solubilidade (S) foi determinada a 80 °C de acordo com método descrito em Gunaratne e Corke (2007). O fator de expansão (FE) dos amidos nativos foi determinado conforme metodologia de Tester e Morrison (1990). Amostras dos amidos (200 mg) foram pesadas em tubos de centrífuga (50 mL) e 5 mL de água destilada foram adicionados. Os tubos foram tampados e colocados em banho Dubnoff nas temperaturas de 65, 75, 85, 95 °C, sob agitação constante, por 30 min. Em seguida, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, e 0,5 mL de dextrana azul (5 mg.mL^{-1}) foi adicionado. Os tubos foram delicadamente agitados por inversão manual após adição da dextrana azul, então, centrifugados a $2000 \times g$ por 5 min e a absorvância do sobrenadante (A_s) foi medida a 620 nm em espectrofotômetro. A absorvância do tubo de referência (A_r), no qual não havia amido, também foi medida.

O FE foi calculado baseado na massa (m) do amido corrigido para base seca, assumindo como densidade do amido o valor de $1,4 \text{ g.mL}^{-1}$. Água livre ou sobrenadante intersticial (AL) foi dada por:

$$AL \text{ (mL)} = 5,5 (Ar / As) - 0,5 \quad (3)$$

O volume inicial do amido (V_0) é:

$$V_0 \text{ (mL)} = m \text{ (g)} / 1,4 \quad (4)$$

E o volume de água intragranular absorvida (V_1):

$$V_1 = 5,0 - AL \quad (5)$$

Então, tem-se que o volume de inchamento dos grânulos de amido (V_2) é:

$$V_2 = V_0 + V_1 \quad (6)$$

$$FE = V_2 / V_0 \quad (7)$$

Onde:

m - massa de amostra (em gramas)

As - absorvância do sobrenadante

Ar - absorvância do tubo de referência.

4.2.1.10 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos nativos foram determinadas utilizando um Rápido Viscoanalisador (RVA-4, Newport Scientific, Austrália) de acordo com o procedimento descrito por Putseys et al. (2010) com modificações. Suspensões de amido (10 % m/m, num total de 27,5 g) foram colocadas em recipientes de alumínio próprios do equipamento, e estes acoplados ao RVA. No início da análise, o RVA foi mantido a 40 °C durante 2 min; após este tempo, foi aquecido a 95 °C em 11 min a uma razão de 5 °C.min⁻¹, e permanecendo nesta temperatura por 10 min; então o RVA foi resfriado a 40°C também a uma taxa de 5°C.min⁻¹ e permaneceu nesta temperatura por 20 min. Foram necessários 54 min para completar o experimento. Durante todo o experimento o RVA manteve as suspensões sob agitação a 160 rpm. O programa Termoclines for Windows, versão 2.2 (Newport Scientific, Austrália) foi utilizada para o processamento dos resultados. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.1.11 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativos foram determinadas utilizando um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, Waltham, EUA), baseando-se na metodologia descrita por Boltz e Thompson (1999), com modificações.

Amostras de 2 mg (b.s.) dos amidos foram pesadas em porta amostras de alumínio, próprios para o equipamento DSC. Água deionizada (6 μL) foi adicionada, e, os porta amostras foram selados em prensa específica (Perkin Elmer, Waltham, EUA). Após selados, os mesmos foram mantidos por 12 h a temperatura ambiente para uniformizar a distribuição da água. Em seguida, a análise foi realizada em três etapas: na primeira etapa foram aquecidos de 25 a 140 $^{\circ}\text{C}$, na segunda etapa foram resfriados de 140 a 25 $^{\circ}\text{C}$, e na terceira etapa foram reaquecidos de 25 a 140 $^{\circ}\text{C}$, todas as etapas foram realizadas a uma razão de 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Um porta amostra de alumínio vazio foi utilizado como referência.

As temperaturas de transição (inicial, pico e final) e a variação de entalpia (ΔH) dos amidos durante aquecimento, resfriamento e reaquecimento foram determinadas utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, Waltham, EUA). Todas as análises foram realizadas em, no mínimo, triplicata.

4.2.1.12 Sinérese de pasta

A sinérese das pastas dos amidos nativos foi determinada a partir da metodologia descrita por Hood e Seifried (1974). Géis de amidos com concentração de 8% m/v foram preparados e estocados em geladeira a 7 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias para determinação da sinérese. Após estocagem, os géis foram centrifugados a 2000 x g por 10 min e o líquido liberado foi pesado e expresso em porcentagem da massa total da amostra ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

4.2.1.13 Transparência de pasta

A transparência dos géis dos amidos nativos com concentração de 8% (m/v) foi determinada pela medida do percentual de transmitância (T%) a 650 nm, em triplicata, conforme metodologia de Craig et al. (1989).

4.2.2 Estudos da adição do GMS e/ou da β CD nos amidos de cereais

Os estudos *in vitro* da adição do GMS e/ou da β CD aos amidos foram realizados usando amido nativo com ou sem adição de 3% de β CD na presença de 0, 1, 2, e 3% de GMS. A β CD foi incorporada na forma de pó sendo misturada ao amido antes da adição da água, enquanto o GMS foi aquecido em água a 70 °C, antes da incorporação do amido com ou sem β CD.

Determinações de amilose lixiviada, fator de expansão, propriedades de pasta, propriedades térmicas, sinérese e transparência dos géis foram realizadas de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

4.2.3 Preparação dos complexos amido-emulsificante

A preparação do complexo amido-GMS foi baseada no procedimento descrito por Galloway, Biliaderis e Stanley (1989). Amostras de 4 g de amido foram dissolvidas em 25 mL DMSO. Esta solução foi diluída em 375 mL de água destilada fervente e mantida por 30 min em banho-maria com agitação. O GMS (1, 2, e 3% p/v) foi dissolvido em etanol pré-aquecido (65 °C). A solução de GMS foi adicionada gota a gota à solução de amido com agitação contínua. A β CD (3% m/m), quando presente, foi adicionada diretamente na solução de amido. A mistura foi incubada a 90 °C, por 4 h com agitação a cada 30 min.

A mistura foi resfriada lentamente à temperatura ambiente por aproximadamente 16-20 h em garrafa térmica. O complexo foi recuperado por centrifugação a 15 000 x g por 20 min à 6 °C, lavados três vezes com água destilada, centrifugados a 15 000 x g por 15 min a 6 °C e então liofilizados.

4.2.4 Análise dos complexos produzidos

Análises de microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e difração de raios-X dos complexos sintetizados dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose com 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% β CD foram realizadas conforme metodologias descritas nos itens 4.2.1.3, 4.2.1.4 e 4.2.1.7, respectivamente. No entanto, para a microscopia de força atômica a suspensão dos complexos (5 mg.mL⁻¹) foram depositadas diretamente sobre o substrato de mica sem o prévio tratamento com a cola.

4.2.4.1 Propriedades térmicas

Amostras de 2 mg (b. s.) dos complexos sintetizados foram pesadas em porta amostras de aço inox, próprios para o equipamento DSC. Água deionizada (12 μL) (KARKALAS et al., 1995) foi adicionada, e, os recipientes foram selados em prensa específica (Perkin Elmer, Waltham, EUA). Após selados, os recipientes foram mantidos por 12 h a temperatura ambiente para uniformizar a distribuição da água. Em seguida, a análise foi realizada em três etapas: 1. aquecimento de 25 a 200 $^{\circ}\text{C}$; 2. resfriamento de 200 a 25 $^{\circ}\text{C}$; 3. reaquecimento de 25 a 200 $^{\circ}\text{C}$; Todas as etapas foram realizadas a uma razão de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Um porta amostra de aço inox vazio foi utilizado como referência.

As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia (ΔH) dos complexos amido-lipídios durante aquecimento, resfriamento e reaquecimento foram determinadas utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, Waltham, EUA). Todas as análises foram realizadas em, no mínimo, triplicata.

4.2.4.2 Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade *in vitro* foi realizada seguindo o método de Englyst et al. (1992). Amostras de 0,5 g foram pesadas em béqueres, adicionadas de 20 mL de tampão acetato 0,1 M e pH 5,2, e colocadas no banho térmico a 37 $^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 5 min. Em seguida, 5 mL de preparado de enzimas (pancreatina, amiloglucosidade e invertase) foi adicionada e imediatamente foi retirado uma alíquota de 0,5 mL nos tempos de 0, 20 e 120 min e colocados em tubos contendo etanol absoluto. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 \times g por 5 min e a glicose liberada com 20 e 120 min, foram quantificadas usando o kit de glicose oxidase-peroxidase. Para quantificação do amido resistente (AR), os béqueres foram adicionados de KOH 7 M e incubados em banho de água a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL foi retirada e adicionada em béquer contendo ácido acético 0,5 M. A amiloglucosidase (50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada e a mistura foi incubada em banho a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Em seguida, o béquer foi colocado em banho fervente por 10 min e resfriado a temperatura ambiente. Uma alíquota de 5 mL foi retirada e adicionado em tubos contendo água destilada que foram centrifugados a 3000 \times g por 5 min, e o AR foi quantificado usando o kit de glicose oxidase-peroxidase.

Os valores de frações de amido rapidamente digeríveis (ARD), amido lentamente digeríveis (ALD) e o AR foram obtidos baseado nas definições de Englyst et al. (1992) que

combinou os valores de G20 (glicose liberada após 20 min), G120 (glicose liberada após 120 min), FG (glicose livre) e TG (glicose total) usando as seguintes equações:

$$\text{ARD (\%)} = (\text{G20} - \text{FG}) \times 0,9 / \text{TS} \quad (8)$$

$$\text{ALD (\%)} = (\text{G120} - \text{G20}) \times 0,9 / \text{TS} \quad (9)$$

$$\text{AR (\%)} = [\text{TS} - (\text{ARD} + \text{ALD})] / \text{TS} \quad (10)$$

4.2.5 Análise estatística

Todos os dados foram obtidos em no mínimo duplicata. Os dados foram avaliados através do programa Statística 7.0 (STATSOFT, 2007), abrangendo a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS NATIVOS

5.1.1 Composição Química

Os teores de umidade dos amidos apresentaram-se dentro da faixa de 10-15%, considerada ótima para amidos, evitando-se amidos muito secos e com provável degradação estrutural, ou amidos com alta atividade de água, que favorece a proliferação de microrganismos (TESTER, 1997). A pureza do amido depende da quantidade de constituintes menores, como lipídios, proteínas, fósforo e cinzas, que variam com a fonte botânica e o processo de extração. No entanto, baixas concentrações de lipídios e cinzas e ausência de proteína aderida aos grânulos são desejáveis.

A composição química dos amidos em relação à matéria seca é apresentada na Tabela 2. Os teores de carboidratos obtidos para todos os amidos foram elevados, variando de 99,1% para o amido de milho com alto teor de amilose a 99,7% para o amido de milho ceroso. Estes resultados indicam que os amidos apresentaram alto grau de pureza, e, o processo de extração do amido de trigo, em laboratório, foi eficiente.

Tabela 2- Composição química do amido de trigo e dos amidos de milho com diferentes níveis de amilose (% em relação a matéria seca)¹.

Componentes (%)	Amidos			
	Trigo	Milho normal	Milho ceroso	Milho c/ alto teor amilose
Carboidratos totais ²	99,20	99,50	99,70	99,10
Proteínas	0,23 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,58 ± 0,03
Lipídios	0,75 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Cinzas	0,13 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Fósforo	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00

¹Valores médios de 3 repetições seguidos pelos desvios-padrão.

Dentre os constituintes menores dos amidos, os teores de lipídios livre e fósforo são os mais importantes, pois modificam as propriedades funcionais dos amidos. Devido a maiores concentrações de lipídios nos amidos de cereais, estes estão mais sujeitos a complexações. O teor de lipídios dos amidos estudados variou de 0,12 a 0,75%, sendo o maior valor encontrado para o amido de trigo e o menor para o amido de milho ceroso. Estes resultados são similares aos encontrados na literatura. Morrison (1995) encontrou 0,70% de lipídios em amido de trigo e

0,20% em amido de milho ceroso, enquanto Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009) encontraram 0,27% em amido com alto teor de amilose. Em amidos de cereais, os lipídios não são retirados com facilidade, pois a maioria encontra-se esterificado com ácido fosfórico ou pode estar associado à amilose (MORRISON, 1988; NELLES et al., 2000), sendo portanto, compreensível o menor conteúdo de lipídios em amidos cerosos. A diferença observada entre o valor obtido para o amido de milho normal e aquele observado por Morrison (1995), 0,80%, e por Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009), 0,12%, pode estar relacionada aos processos de extração, bem como diferentes variedades e condições de cultivo do milho.

O teor de fósforo encontrado para os diferentes amidos variou de 0,01% no amido de milho ceroso e 0,05% no amido de trigo. O fósforo pode ser encontrado nos amidos em três formas principais: monoéster fosfato, lisofosfolipídios (LFL) e fosfato inorgânico. Em amidos de cereais, o fósforo é encontrado principalmente na forma de lisofosfolipídios, enquanto que em amidos de raízes e tubérculos, e em amidos cerosos, se encontra principalmente como monoéster fosfato e, em pequena quantidade, como fósforo inorgânico (KASEMSUWAN; JANE, 1996). Segundo Morrison (1988), o amido de trigo talvez seja a fonte mais pura de LFL apresentando cerca de 0,73 a 1,05% e cujas moléculas duplamente carregadas possuem excelentes características emulsificantes, explicando assim seu maior teor de fósforo em relação aos outros amidos. Este valor foi similar aos encontrados por Franco et al. (2002), quando analisaram oito cultivares de trigo brando. Segundo Jane, Kasemsuwan e Chen (1996), o amido de milho normal possui cerca de 0,02% de fósforo presente nos fosfolipídios, e o amido de milho com alto teor de amilose 0,01% , valores menores que o do amido de trigo, o qual apresenta maior conteúdo de fosfolipídios. Amidos com altos teores de fosfolipídios produzem pastas mais opacas e com menor transmitância, e, limita o inchamento do grânulo (JANE; KASEMSUWAN; CHEN, 1996). Diferenças no teor de fósforo estão relacionadas às variações genéticas dentro de cada espécie (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994).

5.1.2 Morfologia dos grânulos

Na Figura 7 estão apresentadas as micrografias dos grânulos de amidos nativos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose observadas em MEV e, na Figura 8 estão apresentadas imagens em 3D dos amidos estudados a partir de MFA. A forma dos grânulos variou com a fonte botânica.

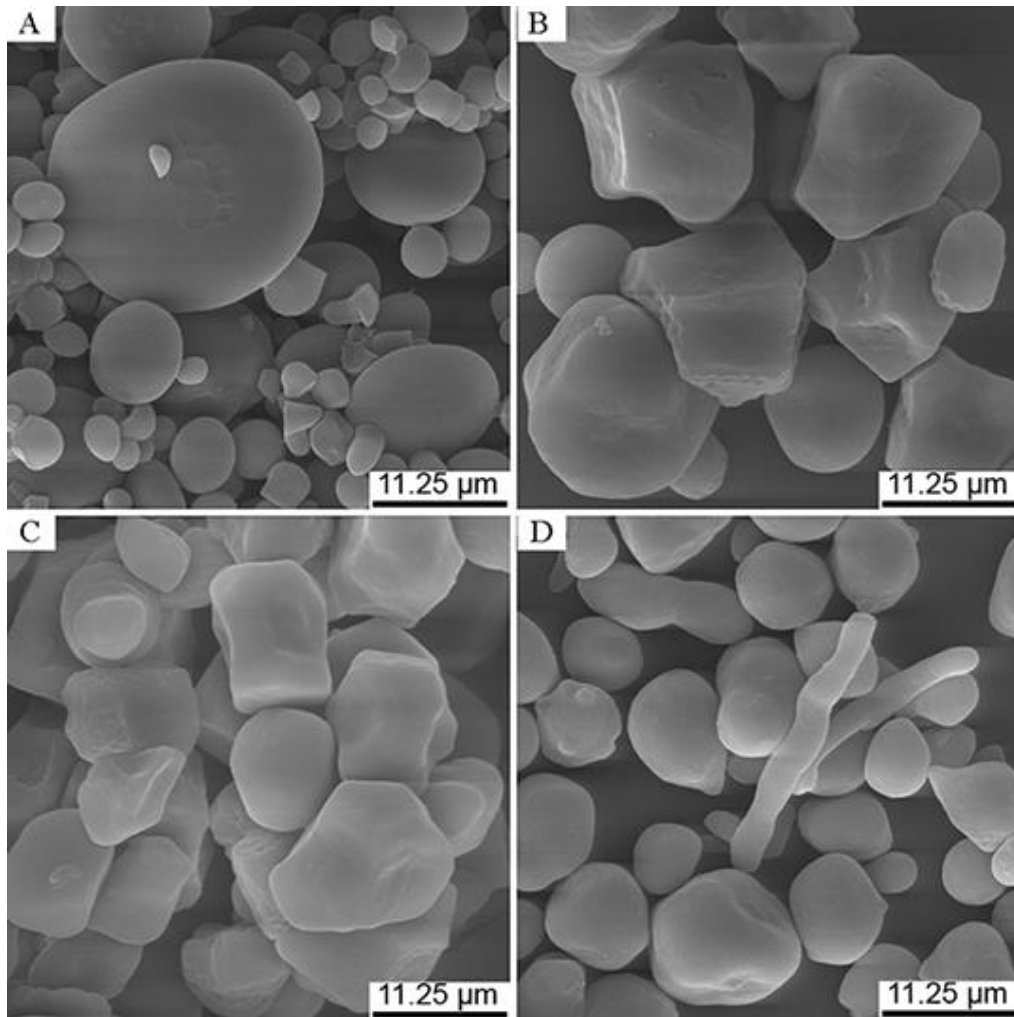


Figura 7: Micrografias dos grânulos dos amidos nativos observados por MEV: A: amido de trigo; B: amido de milho normal; C: amido de milho ceroso e D: amido de milho com alto teor de amilose.

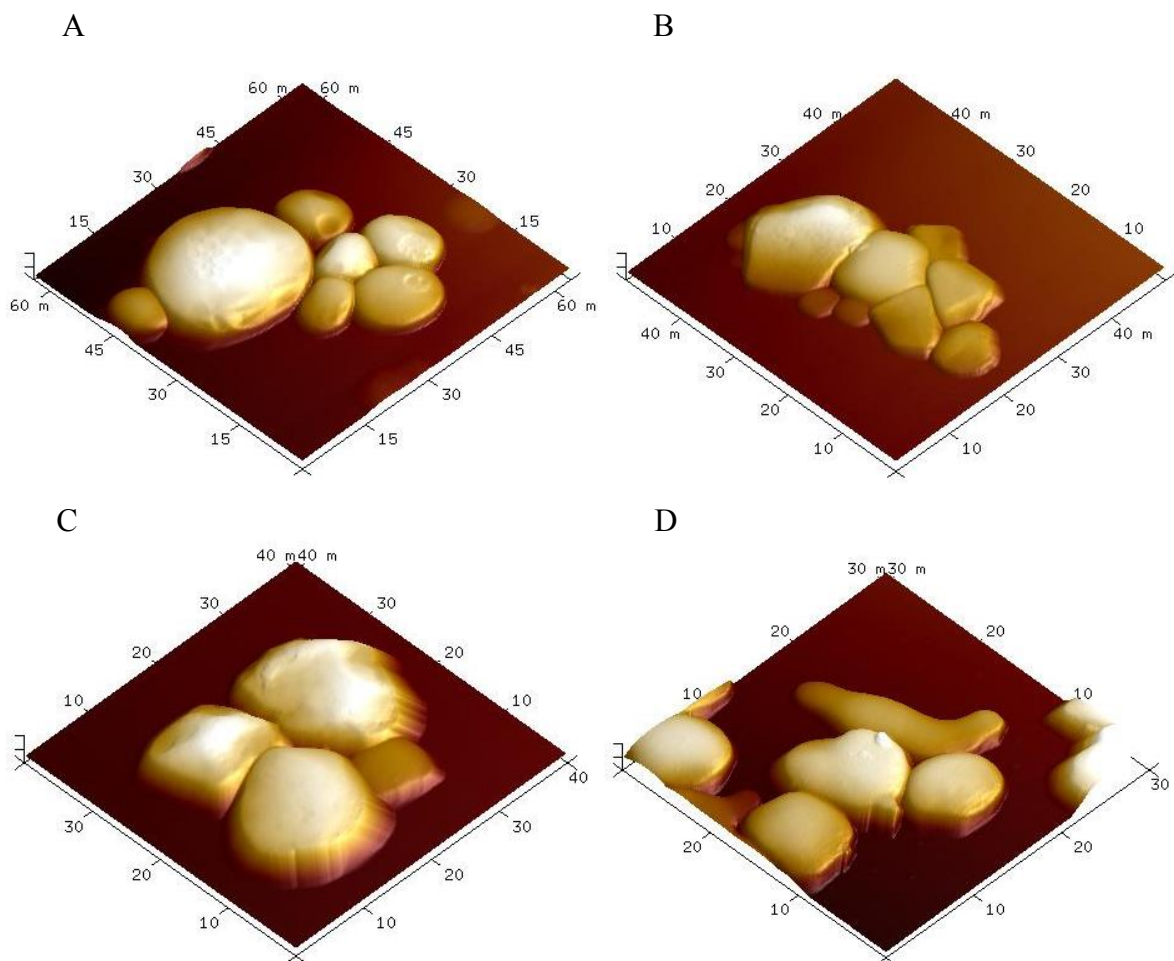


Figura 8: Imagens topográficas em 3D dos grânulos dos amidos nativos observadas por MFA: A: amido de trigo (tamanho da varredura 60 μm x 60 μm); B: amido de milho normal (tamanho da varredura 40 μm x 40 μm); C: amido de milho ceroso (tamanho da varredura 40 μm x 40 μm) e D: amido de milho com alto teor de amilose (tamanho de varredura 30 μm x 30 μm).

Os grânulos de amido de trigo (Figuras 7A e 8A) apresentaram distribuição bimodal. Os grânulos maiores, denominados tipo A, apresentaram formato lenticular e de disco, enquanto os grânulos menores, tipo B, apresentaram formato esférico. As imagens em 3D (Figura 8 A) do amido de trigo mostraram grânulos de diferentes tamanhos, com diâmetros de $\sim 30 \mu\text{m}$ e alturas de $5,79 \mu\text{m}$ para os grânulos maiores (tipo A), e diâmetros de $\sim 11,49 \mu\text{m}$ e alturas de $\sim 3,53 \mu\text{m}$ para os grânulos menores (tipo B). Um exemplo do perfil de medidas obtidas a partir do software NanoScope Analysis é apresentado na Figura 9, onde a imagem topográfica mostrada à esquerda (Figura 9A) representa a visualização da topologia da superfície dos grânulos de amido, e a imagem da direita (Figura 9B) representa a seção transversal dos grânulos correspondente às retas pontilhadas definidas na imagem topográfica. As linhas verticais

pontilhadas azuis, situadas na extremidade e no ponto mais alto do grânulo, resultam na medida de altura do grânulo, representada na linha azul da tabela como distância vertical, enquanto que as duas linhas pontilhadas vermelhas situadas entre as duas extremidades do grânulo resultam na medida do diâmetro, representada na linha vermelha da tabela como distância horizontal.

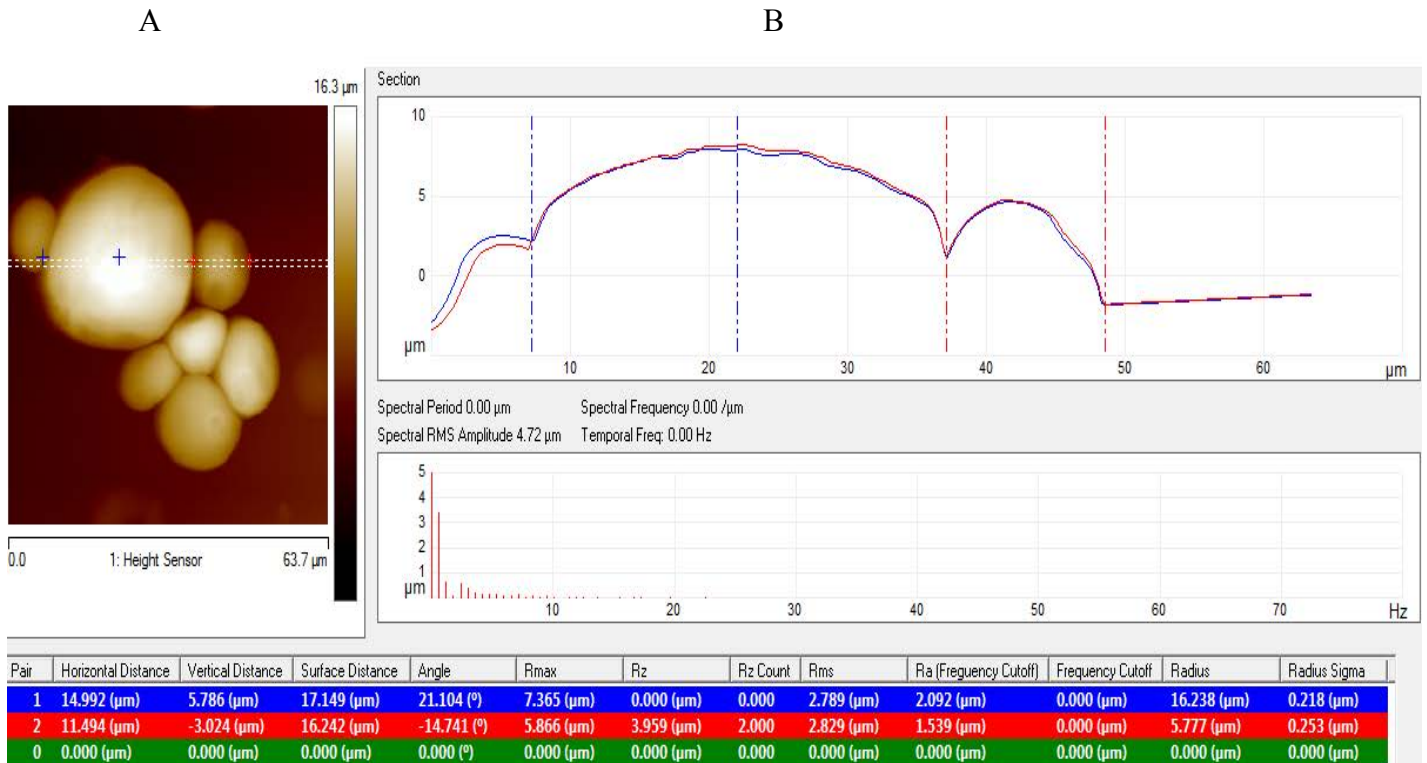


Figura 9: Perfil de diâmetro e altura do amido nativo de trigo, obtido a partir da imagem topográfica observada por MFA.

Os amidos de milho normal (Figuras 7B e 8B) e milho ceroso (Figuras 7C e 8C) apresentaram grânulos com formatos semelhantes. Para ambos os amidos foram observados formatos circulares e poliédricos, sendo que na superfície de alguns grânulos dos amidos de milho normal e ceroso foram notados poros e depressões. Porém, os grânulos do amido de milho normal apresentaram diâmetros variando de 11 a 21 μm e altura de 5 a 11 μm , enquanto os grânulos do amido de milho ceroso apresentaram menor diâmetro (de 8 a 19 μm) e maior altura (de 1 a 13 μm). O amido de milho com alto teor de amilose (Figuras 7D e 8D) apresentou grânulos com formatos cilíndricos, arredondados e alguns grânulos bem alongados, com a superfície mais lisa em relação aos amidos de milho normal e milho ceroso. Os grânulos alongados estão relacionados com o teor de amilose do amido, de modo que a quantidade de grânulos alongados aumenta com o aumento do teor de amilose do amido (JIANG et al., 2010). A imagem em 3D dos grânulos de amido de milho com alto teor de amilose (Figura 8D)

mostrou grânulos com menor diâmetro (6 a 11 μm) e altura (2,9 a 6,7 μm) comparado aos grânulos dos amidos de milho normal e ceroso.

Grânulos de amido com morfologia semelhante às encontradas neste trabalho foram relatados por Ao e Jane (2007) para o amido de trigo; Xie, Liu e Cui (2006) e Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009), para os amidos de milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose.

Na Figura 10 estão apresentadas as imagens dos grânulos de amidos nativos de trigo e milho normal e na Figura 11 dos grânulos de amidos nativos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose, obtidas de imagens de topografia e amplitude a partir da MFA.

As imagens topográficas (A1, D1) e de amplitude (A2, D2) demonstraram que as superfícies dos grânulos de amidos nativos não são uniformemente lisas e regulares devido à sutil rugosidade observada para todas as amostras, e foi notado que existem diferenças nas superfícies dos grânulos de diferentes fontes botânicas. Baldwin et al. (1997) relataram diferenças substanciais nas superfícies dos grânulos de amidos de trigo e batata.

As imagens topográfica, de amplitude, e de contraste de fase (Figura 10, A1, A2, A3) mostraram que os grânulos de amido de trigo apresentaram superfície mais plana, porém rugosa, com baixo contraste de fase, composta por protuberâncias que variaram de 37 a 80 nm de diâmetro. Para o amido de milho normal as imagens topográfica, de amplitude, e de contraste de fase (Figura 10, B1, B2, B3) mostraram superfície mais lisa e com poucas protuberâncias que variaram de 30 a 70 nm. Como as duplas hélices de amilopectina estão empacotadas na forma radial, essas protuberâncias observadas na superfície dos grânulos de amido possivelmente correspondem à maneira como as duplas hélices de amilopectina estão empacotadas dentro dos grânulos de amido. Thomson et al. (1994) e Baldwin et al. (1997) propuseram que essas protuberâncias observadas em MFA são estruturas de “clusters” de amilopectina presentes na região cristalina localizada na periferia do grânulo de amido.

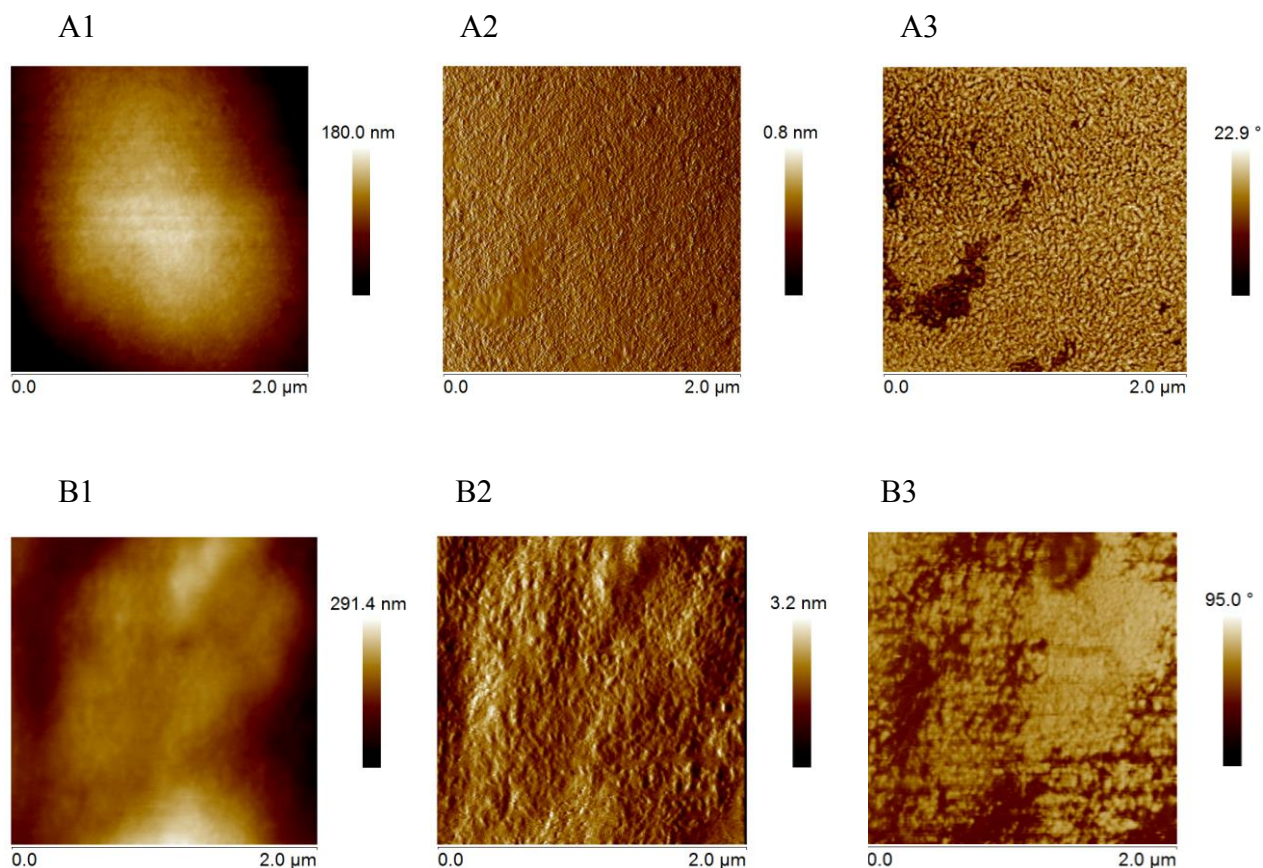


Figura 10: Imagens dos amidos nativos observados por MFA. (1): imagem topográfica com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (2): imagem de amplitude com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (3) imagem de contraste de fase com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm . (A): amido de trigo; (B): amido de milho normal.

As imagens topográfica, de amplitude, e de fase (Figura 11, C1, C2, C3) do amido de milho ceroso mostraram que os grânulos apresentaram a superfície mais rugosa quando comparado aos outros amidos, com maior contraste de fase e protuberâncias mais finas, porém mais compridas (de 60 a 200 nm), possivelmente devido ao baixo teor de amilose (1,1%) nesse amido. O amido de milho com alto teor de amilose (Figura 11, D1, D2, D3) apresentou grânulos com superfície plana e com protuberâncias pequenas que variaram em poucos nanômetros (de 20 - 40 nm). As imagens de contraste de fase mostram regiões predominantemente escuras com maior contraste de fase, indicando que os grânulos são mais rígidos, devido ao alto teor de amilose (49,8%) nesse amido, enquanto, a área mais clara é mais “macia”.

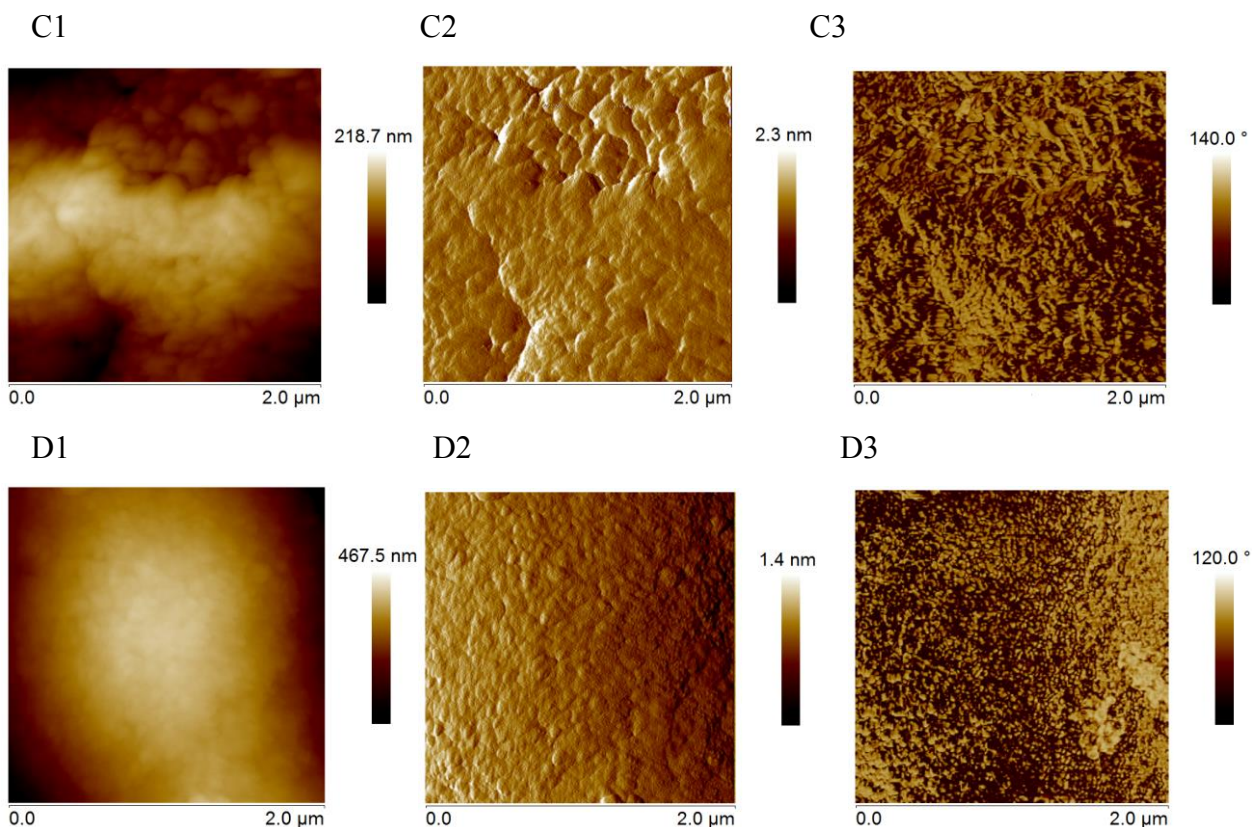


Figura 11: Imagens dos grânulos dos amidos nativos observados por MFA. (1): imagem topográfica com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (2): imagem de amplitude com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm ; (3) imagem de contraste de fase com tamanho de varredura de 2 μm x 2 μm . (C): amido de milho ceroso; (D): amido de milho com alto teor de amilose.

5.1.3 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina

As distribuições do comprimento de cadeias laterais da amilopectina resultantes da desramificação dos amidos nativos estão apresentadas na Figura 12 e os resultados sumarizados na Tabela 3. Os diferentes comprimentos de cadeias laterais da amilopectina dos diferentes amidos foram divididos em 4 grupos de acordo com o grau de polimerização (GP): 6-12; 13-24; 25-36; ≥ 37) conforme classificação de Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996).

Todos os amidos apresentaram distribuição bimodal e dois picos puderam ser observados. O primeiro pico ocorreu no GP 11 para o amido de trigo, e entre os GP $\overline{12}$ -14 para os amidos de milho com diferentes níveis de amilose. O segundo pico ocorreu nos \overline{GP} 40-43. Entre os quatro amidos, o amido de milho com alto teor de amilose apresentou o maior comprimento médio de cadeias (\overline{GP}) 23,60 enquanto o amido de trigo mostrou o menor GP 18,40. Os maiores GP detectados variaram de 67 a 77, sendo o maior detectado para o amido de milho com alto teor de amilose.

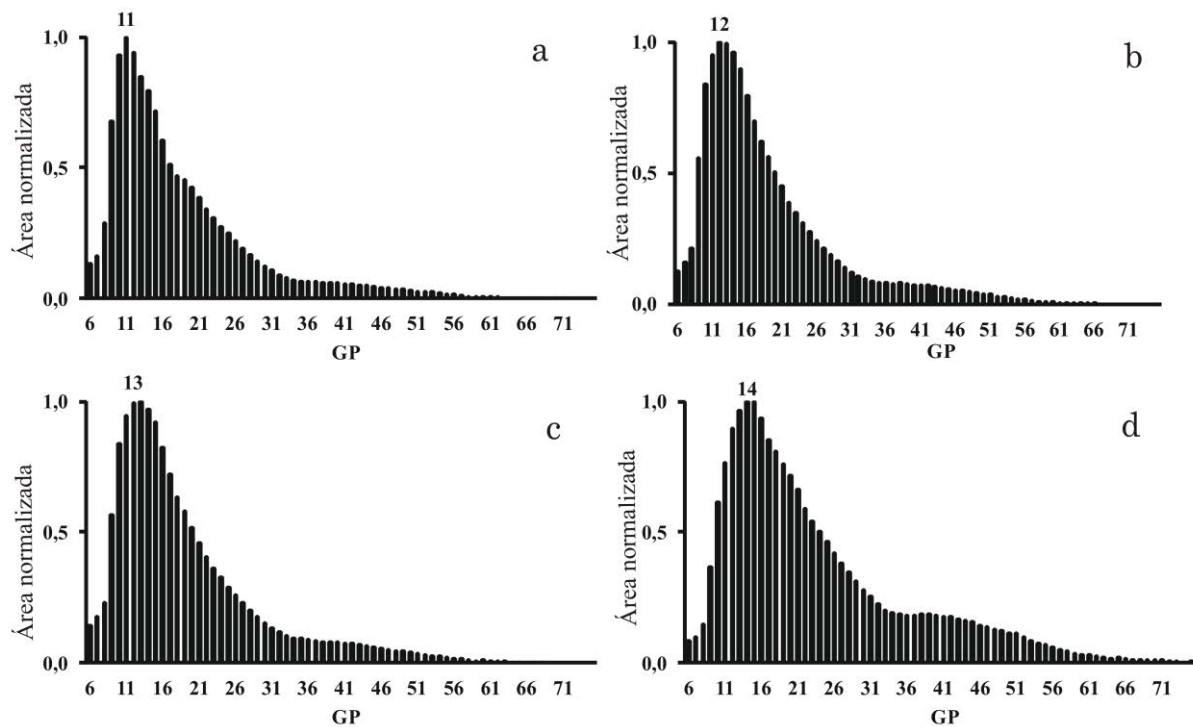


Figura 12: Perfis de distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de trigo (a), milho normal (b), milho ceroso (c), e milho com alto teor de amilose (d), obtidos por HPAEC-PAD.

Tabela 3- Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose.

Amidos	Distribuição (%) ¹				GP ¹	> GP detectado
	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP ≥ 37		
Trigo	32,40 ± 0,1 ^a	48,20 ± 0,10 ^c	12,40 ± 0,00 ^c	6,90 ± 0,00 ^c	18,40	71
Milho normal	26,90 ± 0,00 ^b	52,70 ± 0,00 ^a	12,60 ± 0,00 ^c	7,70 ± 0,00 ^b	19,00	67
Milho ceroso	26,50 ± 0,00 ^b	52,50 ± 0,00 ^a	13,20 ± 0,00 ^b	7,80 ± 0,00 ^b	19,10	68
Milho com alto teor amilose	15,80 ± 0,00 ^c	49,50 ± 0,00 ^b	18,30 ± 0,00 ^a	16,50 ± 0,10 ^a	23,60	77

¹ Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05).

O amido de trigo apresentou a maior proporção (32,4%) de cadeias curtas (GP 6-12) e a menor (6,9%) de cadeias longas (GP ≥ 37), enquanto o amido de milho com alto teor de amilose apresentou a menor proporção (15,80%) de cadeias curtas e a maior (16,50%) de cadeias longas (GP ≥ 37).

Um ombro entre os GP 18-21 foi observado no perfil de distribuição de cadeias laterais da amilopectina do amido de trigo. Segundo Jane et al. (1999), grande parte dos amidos apresentam este ombro apesar dos mesmos apresentarem intensidades diferentes. Em um estudo analisando diferentes amidos esses autores observaram ombros mais intensos em amidos

de trigo, cevada, milho ceroso, amaranto e mandioca, enquanto Rocha et al. (2011) também observaram um ombro de grande intensidade no amido de mandioca-salsa. Ainda segundo Jane et al. (1999), amilopectinas de milho ceroso e milho com alto teor de amilose (V e VII) também apresentam ombros, porém bem menos intensos e muito próximos a altura do primeiro pico na distribuição, enquanto amidos de milho normal, arroz, batata, banana verde e cana não mostram qualquer ombro em seus cromatogramas. Estes ombros estão relacionados a defeitos na estrutura cristalina dos amidos em função da grande quantidade de cadeias curtas que não são capazes de formar cristais (JANE et al., 1999; HANASHIRO; ABE; HIZUKURI, 1996). Neste estudo não foi possível observar, com clareza, esse ombro na distribuição do amido de milho ceroso, porém um ombro de pequena intensidade pode ser observado no amido de milho com alto teor de amilose (Figura 12 D).

5.1.4 Teor de amilose

Do mesmo modo que a amilose, cadeias muito longas da amilopectina podem se ligar ao iodo para formar um complexo helicoidal durante a titulação potenciométrica, desenvolvendo uma coloração azul (JANE et al., 1999) e superestimando a afinidade por iodo e o teor de amilose aparente dos amidos. Por isso as determinações de amilose aparente e absoluta foram realizadas e os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Afinidades por iodo¹ e teores de amilose¹ aparente e absoluto dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose.

Amido	Afinidade por iodo (%)		Teor de amilose (%) ²	
	Amido	Amilopectina	Aparente ³	Absoluto ⁴
Trigo	5,60 ± 0,10 ^b	0,70 ± 0,00 ^b	28,00	25,00
Milho normal	5,70 ± 0,20 ^b	1,10 ± 0,00 ^b	28,70	24,70
Milho ceroso	0,70 ± 0,10 ^c	0,50 ± 0,00 ^c	3,50	1,10
Milho c/ alto teor amilose	12,40 ± 0,10 ^a	4,40 ± 0,50 ^a	62,00	49,80

¹ Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey (p ≤ 0.05).

² Afinidade por iodo da amilose pura foi considerada 20% (TAKEDA; HIZUKURI, 1987).

³ % amilose aparente = (AIA/0,20), onde AIA é a afinidade por iodo do amido integral.

⁴ % amilose absoluto = (AIA - AIAP)/[0.2 - (AIAP/100)], onde AIAP é a afinidade por iodo da amilopectina isolada.

Os amidos de trigo e milho normal apresentaram teor de amilose aparente (~ 28%) e absoluto (~ 25%) semelhantes. As afinidades com iodo das amilopectinas isoladas desses

amidos foram relativamente baixas e corroboram com os resultados apresentados na Tabela 3, em que esses amidos mostraram pequenas proporções de cadeias laterais longas ($GP \geq 37$) da amilopectina. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados por Jane et al. (1999), Yoo e Jane (2002) e Franco et al. (2002).

Como esperado, as afinidades com iodo do amido de milho ceroso e de sua amilopectina isolada foram baixas e semelhantes uma vez que este amido é constituído basicamente de moléculas de amilopectina e estas não apresentam grandes proporções de cadeias longas, Kurakake et al. (2009) praticamente não apresentaram teor de amilose absoluto para amido de milho ceroso $< 1\%$. Por outro lado, tanto o amido de milho com alto teor de amilose como sua amilopectina isolada mostraram elevados valores de afinidade com iodo o que resultou em teores de amilose aparente e absoluto de 62 e 49,80%, respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Jane et al. (1999) para o amilomilho VII. Singh et al. (2003) analisando diferentes amidos de milho com alto teor de amilose encontraram valores de teor de amilose aparente variando de 42,70 a 67,80%. A alta afinidade com iodo do amido com alto teor de amilose corrobora com os resultados apresentados na Tabela 3, em que este amido mostrou alta proporção de cadeias longas ($GP \geq 37$), as quais são capazes de complexar com iodo e superestimar o teor de amilose do amido.

5.1.5 Difração de raios-X

Os padrões de difração de raios-X e as porcentagens de cristalinidade relativa dos amidos estudados estão apresentados na Figura 13.

Os amidos de cereais normalmente apresentam padrão cristalino do tipo A. Dentre os amidos estudados, o amido de milho com alto teor de amilose apresentou padrão cristalino do tipo B, enquanto os outros mostraram padrão tipo A. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (HIZUKURI et al., 1997; JANE et al.1999; WEBER, COLLARES-QUEIROZ, CHANG, 2009). O padrão A é caracterizado por apresentar picos em 15° , 17° e 18° , e em 23° , enquanto o padrão B possui picos em $5,6^\circ$ e 17° , e, um dubleto em 22° e 24° em 2θ (BULÉON et al., 1998), como mostrado por esses amidos na Figura 13.

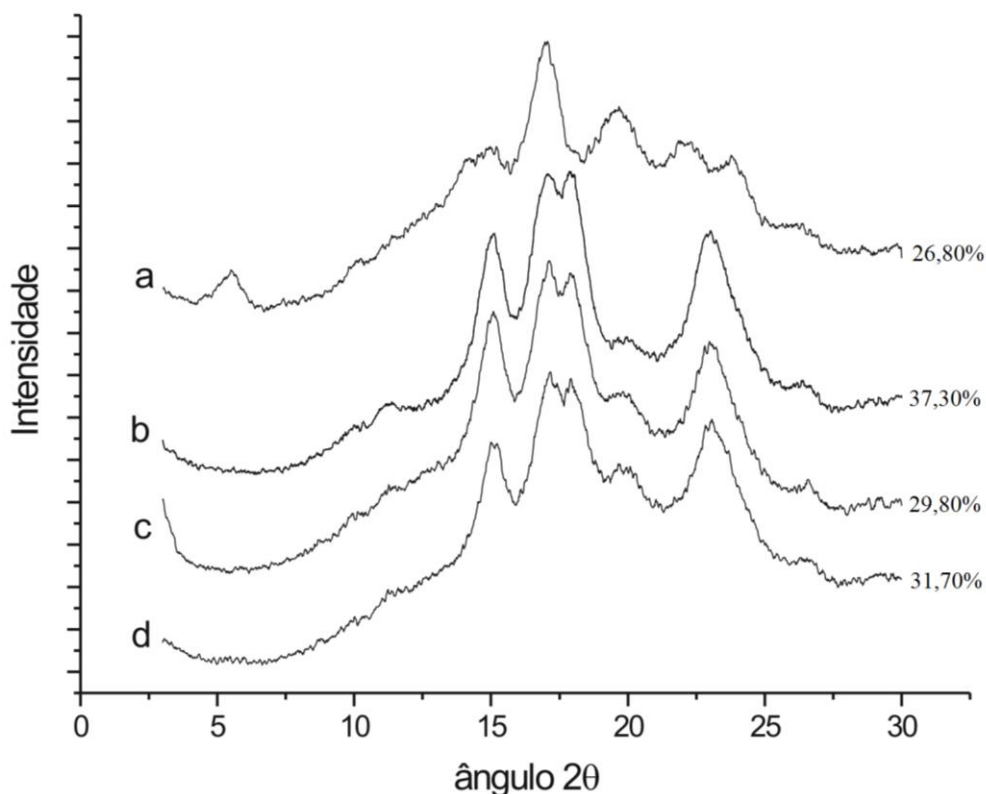


Figura 13: Diffractogramas de raios-X dos amidos de (a) milho com alto teor de amilose, (b) milho ceroso, (c) milho normal e (d) trigo.

Os tipos de polimorfismos A, B ou C são determinados principalmente pelo comprimento médio das cadeias da amilopectina (HIZUKURI et al., 1997). Amidos com grandes proporções de cadeias curtas (GP 6-12) normalmente são associados com o padrão A, enquanto aqueles que possuem poucas proporções de cadeias curtas e mais proporções de cadeias longas ($GP \geq 37$) estão associados ao padrão B (JANE et al., 1999; CHEETHAM; TAO, 1997; JANE, 2006).

A amilopectina é responsável pela estrutura cristalina dos grânulos de amido, os quais apresentam em média de 15 a 45% de cristalinidade (ZOBEL, 1988). A cristalinidade relativa dos amidos estudados variou de 26,80 a 37,30%.

O amido de milho ceroso apresentou a maior cristalinidade relativa, o que pode ser explicado pela maior quantidade de amilopectina deste amido. As cadeias laterais da amilopectina se interagem formando as duplas hélices que se empacotam densamente formando a região cristalina do grânulo. Os amidos de trigo e milho normal apresentaram valores semelhantes de cristalinidade relativa, enquanto o amido de milho com alto teor de amilose apresentou a menor cristalinidade.

Os valores de cristalinidade relativa encontrados neste trabalho para os amidos de milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose são maiores que aqueles encontrados por Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009). Essas diferenças encontradas na literatura podem ser devido a diferenças nos teores de umidade em que os dados foram coletados, uma vez que neste trabalho para a realização dessa análise as amostras foram previamente equilibradas por 10 dias em umidade relativa de 90%, conforme descrito no item 4.2.1.7. O grau de cristalinidade dos amidos aumenta significativamente com a redução no teor de umidade. Embora os amidos apresentem o mesmo perfil de difração de raios-X, os picos se tornam mais pontiagudos e há uma diminuição da região amorfa (CHEETHAM; TAO, 1997). Desta forma, é difícil comparar os resultados com os encontrados na literatura, uma vez que a porcentagem de cristalinidade nos diferentes trabalhos tem sido determinada a diferentes teores de umidade, e em alguns casos os dados são publicados sem qualquer menção do teor de umidade na qual a medida foi realizada.

5.2 EFEITO DA ADIÇÃO DA β -CICLODEXTRINA NOS AMIDOS NATIVOS DE CEREAIS

5.2.1 Amilose lixiviada

As porcentagens de amilose lixiviada dos amidos de cereais sem e com 3% de β CD, em diferentes temperaturas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Porcentagem de amilose lixiviada¹ dos amidos de trigo, milho normal, ceroso e com alto teor de amilose adicionados ou não de 3% de β CD em diferentes temperaturas.

Amidos	Amilose Lixiviada (%)			
	65 °C	75 °C	85 °C	95 °C
Trigo	1,49 ± 0,12 ^{Bc}	15,34 ± 0,43 ^{Bb}	26,78 ± 0,10 ^{Ba}	>100
Trigo + β CD	2,64 ± 0,08 ^{Ac}	25,25 ± 0,12 ^{Ab}	32,36 ± 0,18 ^{Aa}	>100
Milho normal	0,87 ± 0,02 ^{Bc}	15,37 ± 0,17 ^{Ab}	53,32 ± 0,45 ^{Aa}	>100
Milho normal + β CD	1,43 ± 0,05 ^{Ac}	12,69 ± 0,26 ^{Bb}	54,44 ± 0,02 ^{Aa}	>100
Milho ceroso	Nd	1,88 ± 0,04 ^{Ac}	2,56 ± 0,05 ^{Ab}	4,44 ± 0,06 ^{Aa}
Milho ceroso + β CD	Nd	1,07 ± 0,04 ^{Bc}	2,42 ± 0,05 ^{Ab}	3,58 ± 0,10 ^{Ba}
Milho c/ alto teor amilose	Nd	3,56 ± 0,16 ^{Ac}	16,23 ± 0,04 ^{Ab}	23,89 ± 0,42 ^{Aa}
Milho c/ alto teor amilose + β CD	Nd	2,32 ± 0,02 ^{Bc}	15,60 ± 0,02 ^{Bb}	22,27 ± 0,08 ^{Aa}

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha, para cada amido, diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$). nd: não detectado

O teor de amilose lixiviada aumentou significativamente com o aumento da temperatura em todos os amidos, independente da presença da β CD, uma vez que com o inchamento do grânulo durante o aumento da temperatura, moléculas de amilose que não se complexam com lipídios ou que não estão fortemente associadas com moléculas de amilopectina ou de amilose vão sendo liberadas para o meio. Os amidos de trigo e milho normal, independente da presença de β CD, apresentaram teor de amilose lixiviada a 95 °C maior que 100%, indicando que grande parte dos grânulos haviam se rompido nesta temperatura, possivelmente devido as menores temperaturas de gelatinização desses amidos, e que tanto as moléculas de amilose quanto as cadeias mais longas da amilopectina se complexaram com o iodo superestimando o teor de amilose lixiviada. Por outro lado, os amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose não apresentaram amilose lixiviada a 65 °C possivelmente devido a maior temperatura de gelatinização destes amidos.

Os amidos nativos de trigo e milho normal mostraram os maiores teores de amilose lixiviada e isso se deu em função do teor de amilose presente nestes amidos. A 75 °C os valores de porcentagem de amilose lixiviada para ambos os amidos não diferiram. Porém a 85 °C, o amido de trigo apresentou quase a metade da porcentagem de amilose do amido de milho normal. Esses resultados ocorreram porque o amido de trigo possui maior teor de lipídios que o amido de milho, 0,75 e 0,41%, respectivamente (Tabela 2), os quais são constituídos na sua maioria por lisofosfolipídios que são muito suscetíveis a se complexar com amilose. O alto valor de amilose lixiviada do amido de milho normal em relação ao trigo (53,32% e 26,78%, respectivamente) a 85 °C, também indicou que alguns grânulos estão se rompendo devido a maior fragilidade deste amido. Os valores de amilose lixiviada dos amidos nativos de trigo e milho normal estão próximos aos encontrados por Gunaratne e Corke (2007).

O amido de milho ceroso, como esperado, apresentou baixos valores de amilose lixiviada em todas as temperaturas estudadas (Tabela 5) independente da presença de β CD, devido ao baixo teor de amilose deste amido. O teor de amilose lixiviada deste amido a 85 °C foi semelhante ao teor de amilose aparente de aproximadamente 3,5% (Tabela 4), sugerindo que, em função da quantidade muito pequena de lipídios (0,12%) nesse amido (Tabela 2), não houve complexação da amilose ou cadeias longas da amilopectina com lipídios e as mesmas foram lixiviadas durante o inchamento do grânulo. O valor de amilose lixiviada para o amido nativo de milho ceroso a 95 °C aumentou, possivelmente porque cadeias longas de amilopectina podem ter se complexado com o iodo formando coloração azul superestimando desta maneira o valor de amilose lixiviada.

O amido de milho com alto teor de amilose apresentou menor quantidade de amilose lixiviada em relação aos amidos de milho normal e trigo, em todas as temperaturas estudadas. Como esperado, na temperatura de 95 °C foi observado alto valor de amilose lixiviada em relação a outras temperatura estudadas. Neste amido as moléculas de amilose estão fortemente empacotadas e a temperatura de gelatinização é bem mais alta que a de outros amidos (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

As diferenças encontradas no teor de amilose lixiviada dos diferentes amidos estudados podem ser atribuídas a diferenças na quantidade de amilose, interações entre as moléculas de amilose e lipídios presentes nos amidos e interações entre as moléculas do amido.

A adição de β CD afetou a lixiviação da amilose nos amidos de modo diferente. Enquanto no amido de trigo, houve um expressivo aumento no teor de amilose lixiviada em todas as temperaturas analisadas, no amido de milho normal ocorreu uma leve redução a 75 °C, enquanto a 85 °C o teor de amilose lixiviada não se alterou com a adição de β CD. Esses resultados sugeriram que a β CD afetou a formação do complexo amilose-lipídio no amido de trigo durante a gelatinização, provavelmente, pela competição com a amilose pelos lipídios do amido de trigo liberando assim moléculas de amilose que foram lixiviadas para o meio.

Guranatne e Corke (2007) sugeriram que tanto a β CD quanto a hidroxipropil β CD provocam um rompimento do complexo amilose-lipídio nos amidos de cereais e se complexam com os lipídios do amido afetando as propriedades funcionais do amido. Assim, é provável que em função da maior quantidade de lipídios no amido de trigo e também em função dos diferentes tipos de lipídios presentes nos amidos, o amido de trigo tenha sido mais afetado pela adição de β CD que os outros amidos de cereais. O amido de trigo é constituído na sua maioria por lisofosfolipídios, enquanto o amido de milho é constituído de ácidos graxos livres.

5.2.2 Fator de expansão e solubilidade

O FE e S dos amidos nativos sem e com 3% de β CD estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Fator de expansão¹ (FE) em diferentes temperaturas e solubilidade¹ (S) a 80°C dos amidos de cereais adicionados ou não de 3% de βCD.

Amidos	FE				S (80 °C)
	65 °C	75 °C	85 °C	95 °C	
Trigo	13,19 ± 0,10 ^{Bd}	17,50 ± 0,50 ^{Ac}	20,38 ± 0,90 ^{Ab}	28,85 ± 0,20 ^{Ba}	2,10 ± 0,10 ^B
Trigo + βCD	14,90 ± 0,20 ^{Ad}	18,90 ± 0,40 ^{Ac}	20,70 ± 0,60 ^{Ab}	30,80 ± 0,20 ^{Aa}	3,60 ± 0,10 ^A
Milho normal	16,63 ± 0,30 ^{Ad}	18,27 ± 0,70 ^{Ac}	20,80 ± 0,60 ^{Ab}	22,39 ± 0,40 ^{Aa}	2,90 ± 0,10 ^B
Milho normal + βCD	9,60 ± 0,20 ^{Bd}	16,70 ± 0,10 ^{Bc}	17,70 ± 0,30 ^{Bb}	20,60 ± 0,30 ^{Ba}	6,70 ± 0,00 ^A
Milho ceroso	20,34 ± 0,20 ^{Bd}	24,79 ± 0,40 ^{Bc}	33,16 ± 0,80 ^{Ab}	35,21 ± 0,10 ^{Aa}	1,40 ± 0,10 ^B
Milho ceroso + βCD	21,40 ± 0,10 ^{Ad}	30,70 ± 0,70 ^{Ac}	33,90 ± 0,50 ^{Ab}	36,30 ± 0,80 ^{Aa}	4,90 ± 0,00 ^A
Milho c/ alto teor de amilose	1,94 ± 0,00 ^{Bc}	2,30 ± 0,10 ^{Bc}	4,90 ± 0,10 ^{Bb}	6,28 ± 0,20 ^{Aa}	1,30 ± 0,00 ^B
Milho c/ alto teor de amilose + βCD	2,10 ± 0,00 ^{Ac}	3,80 ± 0,10 ^{Ab}	6,80 ± 0,60 ^{Aa}	6,80 ± 0,20 ^{Aa}	4,50 ± 0,10 ^A

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha, para cada amido, diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Os amidos nativos de milho normal e o trigo apresentaram os maiores valores de sólidos solúveis possivelmente devido a maior quantidade de amilose lixiviada desses amidos. O baixo teor de amilose do amido de milho ceroso pode ter influenciado na baixa solubilidade deste amido. No caso do amido de milho com alto teor de amilose, as cadeias lineares de amilose densamente empacotadas necessitam de maiores temperaturas para gelatinizarem, o que pode explicar a baixa solubilidade deste amido.

O FE de todos os amidos estudados aumentou gradativamente com o aumento da temperatura, independente da adição da βCD, uma vez que durante o aquecimento dos amidos em água, as pontes de hidrogênio, responsáveis por manter a estrutura granular, vão sendo gradativamente rompidas e os grânulos vão inchando livremente até que se rompem liberando as moléculas de amido para o meio. Segundo Tester e Morison (1990), o inchamento do grânulo é principalmente uma propriedade da amilopectina, e a amilose age como um diluente sendo responsável por manter as moléculas de amilopectina unidas durante o inchamento, mantendo, com isso, a integridade dos grânulos (JANE, 2006). Isso explica os resultados obtidos para o FE dos diferentes amidos, com maiores valores para o amido de milho ceroso e menores para o amido de milho com alto teor de amilose.

O amido nativo de trigo apresentou menor FE que o amido nativo de milho normal a 65 °C indicando que este amido apresentava forças associativas mais fortes que o amido de milho

normal. Nas temperaturas de 75 e 85 °C esses amidos apresentaram FE similares, porém o FE do amido de trigo foi maior que o FE do amido de milho normal quando determinados a 95 °C. O amido de trigo possui uma distribuição de tamanho de grânulos bimodal, apresentando grânulos tipo A e tipo B (YONEMOTO; CALORI-DOMINGUES; FRANCO, 2007). Isso faz com que os grânulos de tamanhos muito diferentes não inchem ao mesmo tempo. Assim, a 95 °C, é provável que boa parte dos grânulos de amido de milho já estivessem se rompendo enquanto no amido de trigo houvesse ainda um número considerável de grânulos inchando e provocando um aumento acentuado do FE.

Após a adição da β CD, todos os amidos estudados apresentaram aumento na solubilidade, sendo este aumento mais expressivo para o amido de milho normal. Da mesma maneira que ocorreu com os resultados de amilose lixiviada, o FE do amido de trigo aumentou com a adição da β CD, enquanto ele reduziu no amido de milho normal. Porém o FE dos amidos de milho ceroso e de milho com alto teor de amilose, também, aumentaram com a adição de β CD.

Conforme observado por Kim e Hill (1984) e confirmado por Gunaratne e Corke (2007), o efeito da β CD no aumento do FE e S ocorre durante o segundo estágio da gelatinização, quando ocorre uma hidratação extensiva e o amido solubilizado é liberado para o meio. No entanto, o aumento do FE e S para o amido de trigo, sugeriu o rompimento do complexo natural amilose-lipídio pela β CD. A β CD quando complexada com outras moléculas é menos solúvel e mais estável (GUNARATNE; CORKE, 2008).

Esses resultados estão de acordo com os resultados observados por Gunaratne e Corke (2007; 2008) que também observaram aumento no FE de amidos de trigo, milho ceroso e milho com alto teor de amilose. Kim e Hill (1984) e Gunaratne e Corke (2007) ao avaliarem o efeito da β CD nas propriedades de gelatinização de amidos de trigo, relataram que a β CD pode destruir o complexo amilose-lipídio, para complexação com os lipídios dos amidos, aumentando assim, o poder de inchamento, amilose lixiviada e solubilidade dos amidos. Esses autores também observaram aumento, em menor extensão, no FE do amido de milho quando β CD foi adicionada, resultados que também esperava. No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostraram uma redução nos valores de FE para o amido de milho normal.

5.2.3 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos adicionados ou não de 3% de β CD, determinadas por meio de RVA, estão mostradas na Tabela 7.

Tabela 7- Propriedades de pasta¹ de amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados ou não de 3% de β CD.

Amidos	Temperatura de pasta (°C)	Viscosidade (RVU)			
		Pico	Quebra	Final	Setback
Trigo	91,50 ± 0,50 ^a	196,2 ± 4,0 ^a	53,0 ± 2,8 ^a	351,7 ± 3,8 ^b	205,8 ± 3,1 ^b
Trigo + β CD	89,70 ± 0,20 ^b	192,6 ± 0,4 ^b	51,4 ± 0,4 ^a	432,6 ± 0,1 ^a	290,5 ± 0,7 ^a
Milho normal	76,84 ± 0,20 ^a	253,3 ± 0,9 ^a	105,1 ± 0,4 ^b	539,8 ± 0,2 ^a	391,5 ± 0,8 ^a
Milho normal + β CD	76,23 ± 0,30 ^a	245,1 ± 1,2 ^b	117,4 ± 1,5 ^a	526,2 ± 2,6 ^a	378,5 ± 2,2 ^b
Milho ceroso	70,61 ± 0,20 ^a	295,9 ± 3,0 ^a	206,5 ± 3,8 ^a	136,2 ± 3,6 ^a	42,9 ± 0,2 ^b
Milho ceroso + β CD	70,70 ± 0,00 ^a	293,8 ± 1,4 ^a	208,4 ± 0,5 ^a	129,9 ± 1,7 ^a	44,6 ± 0,2 ^a
Milho de alta amilose	95,05 ± 0,00 ^a	3,1 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,0 ^b
Milho de alta amilose + β CD	95,00 ± 0,00 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	4,3 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna, para cada amido, diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

As propriedades de pasta dos amidos dependem basicamente da proporção amilose/amilopectina, comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina, presença de lipídios e fósforo, entre outras características. De um modo geral, os amidos de cereais apresentam maior temperatura de pasta, maior resistência ao cisalhamento e à temperatura, menor viscosidade a quente e maior viscosidades de *setback* do que os amidos de tubérculos e raízes, devido ao seu maior teor de amilose e lipídios (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994).

Entre os amidos de trigo, milho normal e milho ceroso, o amido de trigo apresentou a maior temperatura de pasta, menores viscosidades de pico e de quebra e maiores viscosidades final e tendência a retrogradação (*setback*), seguido do amido de milho normal. A temperatura de pasta determina o início do inchamento dos grânulos, quando a viscosidade aumenta e o aparelho detecta a primeira resistência para manter a agitação constante. Quanto menor esta temperatura, maior a facilidade de cozimento do amido. Altas temperaturas de pasta refletem uma maior resistência do amido a gelatinização causada por uma maior estabilidade estrutural (TESTER; MORRISON, 1990). A presença de lipídios nos amidos de trigo e milho normal e principalmente de lisofosfolipídios no amido de trigo resulta em pastas com menores

viscosidades e com maior opacidade, devido à tendência desses compostos de formarem complexos com a amilose e com cadeias ramificadas muito longas da amilopectina, resultando em um inchamento limitado. A ação da amilose no comportamento de gelatinização do amido é ao mesmo tempo diluente e inibidor do inchamento (SINGH et al.; 2003).

A tendência a retrogradação (*setback*) representa a capacidade da amilose se reorganizar durante o resfriamento da pasta formando um gel. A maior tendência a retrogradação foi apresentada pelo amido de milho normal (391,5 RVU), seguida do amido de trigo (205,8 RVU), milho ceroso (42,9 RVU).

O amido de milho ceroso, composto basicamente por moléculas de amilopectina, e apresentando teores muito baixos de lipídios (0,12%) (Tabela 2), apresentou maiores viscosidades de pico e quebra, além de baixa tendência a retrogradação. A presença de amilopectina favorece o inchamento dos grânulos de amido, enquanto a amilose e os lipídios o inibem (JANE et al., 1999; SINGH et al., 2003). A ausência de amilose (1,10%) (Tabela 4) contribuiu para a baixa tendência a retrogradação do amido de milho ceroso.

O amido de milho com alto teor de amilose não apresentou qualquer viscosidade durante todo o experimento, independente da adição de β CD, possivelmente devido à temperatura de gelatinização muito alta deste amido. Este amido não gelatinizou completamente sob as condições de cozimento do RVA, uma vez que a maior temperatura que o equipamento registrou durante o experimento foi 95 °C.

Na presença de β CD, a temperatura de pasta reduziu levemente para o amido de trigo (de 91,5 para 89,7 ° C), enquanto ela não se alterou para os outros amidos. A adição de β CD provocou leve redução na viscosidade de pico (de 196,2 para 192,6 RVU) e quebra (de 53,0 para 51,4 RVU) no amido de trigo enquanto no amido de milho normal, a viscosidade de quebra aumentou (de 105,1 para 117,4 RVU). O *setback* aumentou no amido de trigo (de 205,8 para 290,5 RVU) e diminuiu no amido de milho normal (de 391,5 para 378,5 RVU).

De um modo geral, as propriedades de pasta dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose não se alteraram com a adição de β CD.

A leve redução na viscosidade de pico no amido de trigo está de acordo com os resultados de FE deste amido. Segundo Gunaratne e Corke (2007), os grânulos mais inchados são mais suscetíveis a se desintegrar a altas temperaturas e atrito, reduzindo então a viscosidade de pico. O aumento do FE no amido de trigo com β CD não foi muito expressivo (Tabela 6), mas suficiente para acelerar o rompimento de alguns grânulos submetidos ao atrito, reduzindo levemente a viscosidade de pico deste amido. Os autores também sugeriram que o rompimento

do complexo amilose-lipídio pode enfraquecer a estrutura do amido. Por outro lado, no amido de milho normal, a redução na viscosidade de pico provavelmente foi decorrente da redução no FE (Tabela 6) observado neste amido na presença de β CD. Nesse caso, os grânulos incharam menos alcançando uma menor viscosidade de pasta. Kim e Hill (1984) e Guranatne e Corke (2007) também observaram redução da viscosidade de pico e *setback* no amido de milho normal sugerindo que as grandes moléculas de β CD poderiam interferir na associação das cadeias de amilose.

O aumento no *setback* do amido de trigo adicionado de β CD também pode ser explicado pelo maior teor de amilose lixiviada deste amido, a qual estava livre para retrogradar.

5.2.4 Propriedades térmicas

Para a maioria dos amidos de cereais as endotermas apresentam dois picos. O primeiro pico depende da cristalinidade do grânulo de amido e o segundo está relacionado ao complexo amilose-lipídio (TANG; WATANABE; MITSUNAGA, 2002). A análise térmica dos amidos foi realizada em três etapas. No primeiro ciclo de aquecimento (25 a 140 °C) para observação dos picos de gelatinização do amido e de dissociação do complexo natural amido-lipídio. Na etapa de resfriamento (140 a 25 °C) para observação da recomposição do complexo natural amido-lipídio dissociado, e, no segundo ciclo de aquecimento para observação da dissociação do complexo amido-lipídio recomposto.

As temperaturas iniciais de gelatinização no primeiro ciclo de aquecimento, para todos os amidos estudados (Figura 14), foram menores que as temperaturas de pasta obtidas no RVA. Essa diferença observada está relacionada à sensibilidade dos aparelhos, o DSC é muito mais sensível, a ponto de detectar quando os primeiros grânulos começam a se desorganizar, determinando a temperatura inicial de gelatinização (JANE et al., 1999), enquanto o RVA detecta os primeiros acréscimos na viscosidade da pasta de amido.

O amido de trigo apresentou as menores temperaturas de gelatinização (t_o , t_p e t_f) entre os amidos estudados (Figura 14, A, I, a), apesar de ter teor de amilose muito semelhante ao do amido de milho normal. Porém, o amido de trigo apresentou maior teor de lipídios e fósforo o que contribuiu para sua menor temperatura de gelatinização (VERMEYLEN et al., 2004). Este amido também apresentou um ombro no GP 18-21 (Figura 12) que caracteriza defeito em sua estrutura cristalina, o qual também contribuiu para sua menor temperatura de gelatinização (JANE et al., 1999), quando comparada ao amido de milho normal.

Os amidos de trigo e milho normal apresentaram os menores ΔH (11,47 e 12,42 J/g, respectivamente), o que está relacionado ao teor de amilose destes amidos. Amidos com maiores teores de amilose, possuem mais regiões amorfas e menos regiões cristalinas, e, portanto, menor energia é necessária para a fusão dos cristais. A dissociação das longas duplas hélices na região cristalina requer mais energia do que o rompimento das ligações de hidrogênio na região amorfa (SINGH et al., 2003).

Esses amidos apresentaram as menores faixas (9,64 °C) de temperaturas de gelatinização, indicando maior homogeneidade de seus cristais. A faixa de temperatura de gelatinização obtidas por DSC reflete a extensão da perfeição cristalina, assim, quanto maior a faixa de temperatura menor a homogeneidade dos cristais. (TESTER, 1997).

Os amidos de milho ceroso e com alto teor de amilose apresentaram os maiores valores de temperatura de gelatinização (Figura 14, A, III, IV). Altas temperaturas de gelatinização estão relacionadas a estruturas cristalinas mais densamente empacotadas e à maior ordem molecular (SRICHUWONG et al., 2005) e também são apresentadas para amidos com padrão cristalino tipo A (JANE et al., 1999). O amido de milho ceroso apresentou a maior cristalinidade relativa (37,30%) (Figura 13). Em amidos que apresentam altas cristalinidades, suas áreas amorfas são mais resistentes à hidratação, e conseqüentemente o início do inchamento e gelatinização são atrasados. Por outro lado, o amido de milho com alto teor de amilose é composto por 49,8% de amilose, apresentando pouca mobilidade molecular devido ao denso empacotamento das moléculas lineares, necessitando de maior temperatura para que suas ligações sejam rompidas e se estabeleçam novas ligações com a água (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

Dos amidos estudados, apenas os amidos de trigo e milho normal mostraram o segundo pico no primeiro ciclo de aquecimento, referente ao complexo amilose-lipídio. O amido de trigo apresentou picos com maiores temperaturas e entalpia que o amido de milho normal (t_{cx} 101,49 e 99,86 °C, e ΔH_{cx} 0,99 e 0,89 J/g, respectivamente para os amidos de trigo e milho normal) sugerindo que a associação do complexo amilose-lipídio no amido de trigo ocorreu de forma mais eficiente, possivelmente devido a maior quantidade de lipídios, bem como ao tipo de lipídio presente em um e outro amido. Os parâmetros frequentemente usados para a caracterização desta transição são a temperatura de pico, também denominada de temperatura do complexo (t_{cx}) e a entalpia do complexo (ΔH_{cx}). Estes valores dependem do lipídio no complexo: quanto maior a cadeias monoacil, maior a t_{cx} e esta diminui quando o grau de instauração na cadeia aumenta (ELIASSON, 1994).

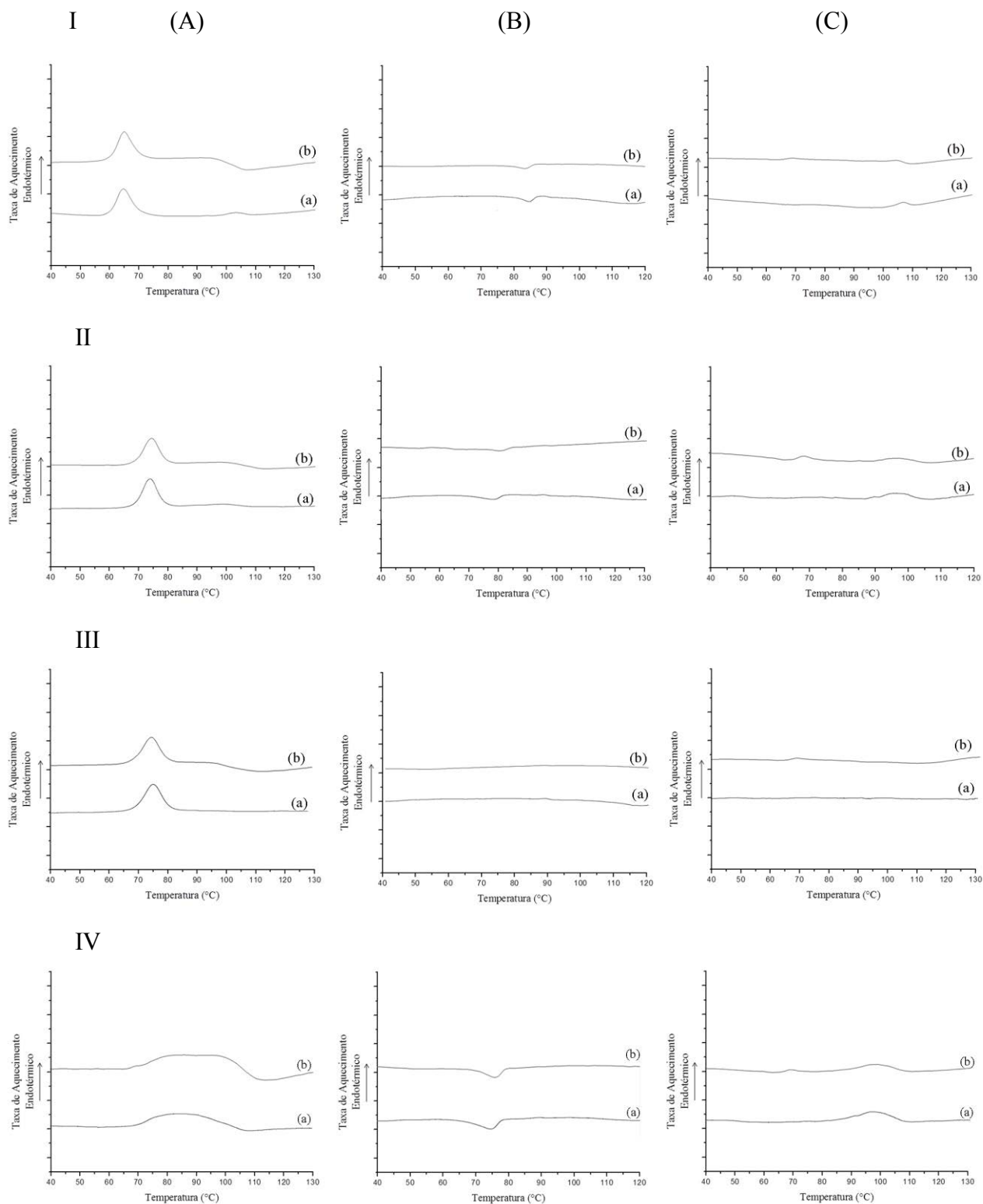


Figura 14: Perfil endotérmico observado por DSC dos amidos I: trigo, II: milho normal, III: Milho ceroso, IV: Milho com alto teor de amilose; (a): Amido nativo, (b) Amido com 3% de β CD. (A): 1º ciclo de aquecimento; (B): resfriamento; (C): 2º ciclo de aquecimento.

Como esperado, o amido de milho ceroso não apresentou o segundo pico referente ao complexo amido-lipídio, devido ao baixo teor de lipídios e amilose (0,12 e 1,10%, respectivamente). Também não foi possível observar no primeiro ciclo de aquecimento, um pico referente ao complexo amilose-lipídio no amido de milho com alto teor de amilose, provavelmente devido à faixa de temperatura de gelatinização deste amido (69,70 a 104,50 °C), a qual engloba as temperaturas de dissociação dos complexos amilose-lipídios.

No ciclo de resfriamento (B), complexos amilose-lipídios foram formados novamente e a recristalização ocorreu nos amidos de trigo e milho normal (Figura 14, B, I, II). Os picos exotérmicos referentes à recristalização foram mais pontiagudos que os picos originais de fusão, porém ocorreram a temperaturas mais baixas que aquelas dos picos de fusão. O amido de milho ceroso não apresentou pico no ciclo de resfriamento independente da presença de β CD (Figura 14, B, III), devido ao baixo teor de lipídios e amilose (0,12 e 1,10%, respectivamente) e, portanto, da ausência do complexo amilose-lipídio neste amido. O amido de milho com alto teor de amilose, também, apresentou um pico exotérmico de recristalização a T_{cx} de 74,74 °C, indicando que o complexo amilose-lipídio estava presente no primeiro ciclo de aquecimento, porém foi mascarado na endoterma em função da ampla faixa de temperatura de gelatinização deste amido (34,85 °C). No entanto, durante o resfriamento o mesmo foi formado novamente e recristalizado.

No ciclo de reaquecimento (C), a fusão dos complexos amilose-lipídios ocorreu novamente a temperaturas superiores àsquelas do primeiro aquecimento, porém com menores ΔH_{cx} . Segundo Eliasson (1994), ΔH_{cx} depende da quantidade de lipídio presente até que a amilose sature. Ainda segundo essa autora, se uma amostra de amido-lipídio é aquecida, resfriada e novamente aquecida no DSC, maiores valores de entalpia são normalmente obtidos durante a segunda corrida em função das melhores condições para formação do complexo após o primeiro aquecimento. No entanto, Sievert e Holm (1993) observaram que o ΔH_{cx} durante o segundo ciclo de aquecimento de um complexo amilose-lisolecitina dependeu da temperatura final de aquecimento durante o primeiro ciclo de aquecimento. Nossos resultados mostraram que o ΔH_{cx} foi menor no segundo ciclo de aquecimento do que no primeiro, porém até o momento estamos nos referindo aos complexos formados naturalmente em função da presença de lipídios nos amidos, ao contrário dos autores que trabalharam com adição de lipídios para a formação dos complexos.

A adição de 3% de β CD não alterou as temperaturas de gelatinização no amido de trigo (Figura 14, A, I, b), porém provocou um leve aumento na temperatura de pico no amido de

milho normal (Figura 14, A, II, b), confirmando dados da literatura (KIM; HILL, 1984; GUNARATNE; CORKE, 2007). A adição de 3% de β CD ao amido de trigo também provocou leve redução na entalpia de gelatinização, porém não foi observada alteração da entalpia no amido de milho normal adicionado de β CD. Extensivas mudanças estruturais na região amorfa do grânulo de amido (maior amilose lixiviada) devido à dissociação do complexo amilose-lipídio na presença da β CD podem facilitar a desestabilização das hélices de amilopectina nas regiões cristalinas dos grânulos (GUNARATNE; CORKE, 2007), o que explica a leve redução na entalpia de gelatinização observada no amido de trigo.

A adição de 3% de β CD não provocou alteração na temperatura de pico e na entalpia de gelatinização no amido de milho ceroso (Figura 14, A, III, b), porém reduziu levemente as temperaturas iniciais e finais de gelatinização deste amido. O amido de milho com alto teor de amilose apresentou significativo aumento nas temperaturas de pico e final (de 85,7 para 96,85 °C e de 104,53 para 108,28 °C, respectivamente) e na entalpia de gelatinização (de 14,33 para 24,56 J/g), sugerindo que a β CD provavelmente interferiu no complexo amilose-lipídio e provavelmente se complexou com o lipídio, e também se dissociou provocando o aumento na entalpia.

A temperatura de dissociação do complexo (t_{cx}) do amido de trigo diminuiu significativamente com a adição de β CD (de 101,49 para 96,28 °C), enquanto a t_{cx} do complexo do amido de milho normal não alterou. A adição de β CD provocou um significativo aumento nos valores de entalpia dos complexos (ΔH_{cx}) nos amidos de trigo e milho normal (de 0,99 para 5,38 J/g e de 0,89 para 3,65 J/g, respectivamente nos amidos de trigo e milho normal). Este resultado sugere que a energia de dissociação requerida para a fusão do complexo seja aquela necessária para a dissociação da molécula de β CD, visto que houve alteração na linha de base do pico, o que não é característico dos complexos naturais amido-lipídios. Houve também uma redução das temperaturas de gelatinização do amido de trigo, e da temperatura inicial do amido de milho normal. Esses resultados sugerem que a β CD interferiu ou promoveu o rompimento do complexo amilose-lipídio.

No ciclo de resfriamento (B) a adição da β CD não alterou as temperaturas, inicial e de pico e aumentou a temperatura final na recristalização do complexo no amido de trigo (de 81,27 para 78,20 °C), enquanto aumentou as temperaturas de transição no amido de milho normal (68,32 para 70,10 °C). No entanto, a adição da β CD provocou uma significativa redução da entalpia na recristalização dos complexos de ambos os amidos, confirmando que a mesma interferiu nos complexos amilose-lipídio com a provável formação do complexo

lipídio- β CD. A adição da β CD no amido de milho com alto teor de amilose também provocou redução na entalpia durante a recristalização do complexo.

No reaquecimento (C), a adição de 3% de β CD provocou um aumento na temperatura de dissociação do complexo do amido de trigo, porém no complexo do amido de milho normal a t_{cx} não foi alterada. Ambos os amidos de trigo e milho normal apresentaram redução do ΔH_{cx} após a adição da β CD, provavelmente devido a uma parte do lipídio ter se associado a β CD e assim, menor energia foi requerida para dissociar uma menor quantidade de complexos amilose-lipídio. Durante o reaquecimento um pico antes da dissociação do complexo amilose-lipídio nos termogramas dos amidos de trigo e milho normal adicionados de β CD também foi observado. Este pico provavelmente correspondeu   dissociação da β CD. Porém, no amido de milho normal este pico foi mais intenso que no amido de trigo.   possível que o maior teor de lipídios no amido de trigo tenha influenciado a capacidade de complexa o com a β CD.

Conforme já esperado, o amido de milho ceroso não apresentou pico endotérmico no ciclo de reaquecimento (C). Porém, após a adição da β CD foi possível observar um leve pico entre 60-70  C, confirmando ser este o pico de dissociação da β CD (Figura 14, C). No reaquecimento do amido de milho com alto teor de amilose (Figura 14, C, IV), a adição da β CD não alterou a t_{cx} , porém também foi observado o pico da dissociação da β CD.

5.2.5 Sinérese de pasta

A sinérese dos géis dos amidos de cereais, adicionados ou não de 3% de β CD e refrigerados por 10 dias, está apresentada na Tabela 8. Os géis frescos não apresentaram sinais de sinérese, como esperado.

A sinérese dos géis refrigerados por 10 dias variou de 0,06 para o amido de milho ceroso a 11,68% para o amido com alto teor de amilose. Com exceção do amido com alto teor de amilose, os valores encontrados para a sinérese concordam positivamente com os valores de *setback* de 205,8, 391,5 e 42,9 RVU para os amidos de trigo, milho normal e milho ceroso, respectivamente (Tabela 7). Durante a retrogradação dos amidos, as moléculas de amilose voltam a se reassociar e novas pontes de hidrogênio são formadas entre essas moléculas liberando as moléculas de  gua. Desse modo, quanto maior a retrogradação da pasta de amido maior a sinérese.

Tabela 8- Sinérese dos géis¹ dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, adicionados ou não de 3% de β CD e refrigerados por 10 dias.

Amidos	Sinérese (%)
	10 dias
Trigo	4,09 \pm 0,10 ^b
Trigo + β CD	5,28 \pm 0,30 ^a
Milho normal	7,09 \pm 0,30 ^a
Milho normal + β CD	5,7 \pm 0,30 ^b
Milho ceroso	0,06 \pm 0,00 ^a
Milho ceroso + β CD	0,01 \pm 0,00 ^b
Milho c/ alto teor amilose	11,68 \pm 0,30 ^a
Milho c/ alto teor amilose + β CD	11,09 \pm 0,50 ^a

¹Média de três determinações \pm Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna para cada amido diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O alto valor de sinérese encontrado para o amido de milho com alto teor de amilose na realidade refere-se à quantidade de água livre que não foi absorvida durante a análise, uma vez que, nas condições do experimento, este amido não foi gelatinizado em função das altas temperaturas de gelatinização.

A adição de β CD aumentou a sinérese no amido de trigo, enquanto diminuiu no amido de milho normal, concordando com os resultados observados para o *setback* desses amidos adicionados de β CD, de 205,8 para 290, 5 RVU e de 391,5 para 378,5 RVU, respectivamente (Tabela 7). Para o amido de milho ceroso a sinérese teve valores mínimos, apresentando uma pequena redução com adição de β CD após 10 dias de armazenamento. A adição de β CD não alterou a sinérese no amido de milho com alto teor de amilose.

5.2.6 Transparência de pasta

A transparência dos géis dos amidos de cereais com e sem 3% de β CD, frescos e refrigerados por 10 dias, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Transparência¹ dos géis dos amidos de cereais adicionados ou não de 3% de βCD, refrigerados por 0 e 10 dias.

Amidos	Transparência (%)	
	0 dias	10 dias
Trigo	19,20 ± 0,20 ^{Aa}	17,70 ± 0,20 ^{Ab}
Trigo + βCD	20,00 ± 0,50 ^{Aa}	15,50 ± 0,60 ^{Bb}
Milho normal	19,10 ± 0,40 ^{Aa}	17,00 ± 0,40 ^{Ab}
Milho normal + βCD	19,90 ± 0,50 ^{Aa}	14,80 ± 0,50 ^{Bb}
Milho ceroso	58,70 ± 1,60 ^{Ba}	47,30 ± 2,30 ^{Bb}
Milho ceroso + βCD	65,30 ± 1,50 ^{Aa}	53,70 ± 2,10 ^{Ab}
Milho c/ alto teor amilose	14,40 ± 1,00 ^{Aa}	14,40 ± 1,00 ^{Aa}
Milho c/ alto teor amilose + βCD	14,20 ± 0,50 ^{Aa}	14,20 ± 0,50 ^{Aa}

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha, para cada amido, diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

A transparência dos amidos é dependente do teor de amilose e da presença de lipídios. Quanto menores os teores de amilose e lipídios, géis mais translúcidos são observados (SCHOCH, 1942; CRAIG et al., 1989)

Assim, a transparência dos géis frescos de amido variou de 14,36 para o amido de milho com alto teor de amilose a 58,70% para o amido de milho ceroso, em função do maior e menor teor de amilose nesses amidos. Os amidos de trigo e milho normal, com teores de amilose similares, também apresentaram transparências de pasta similares, mesmo com o amido de trigo apresentando maior teor de lipídios.

A transparência dos géis dos amidos estudados diminuiu significativamente com a refrigeração, devido o processo de retrogradação que ocorreu durante o período de armazenamento, responsável pelo aumento da opacidade dos géis.

Não houve diferença significativa na transparência dos géis frescos (dia 0) com adição de βCD nos amidos, com exceção do amido de milho ceroso que mostrou maior transparência na presença de βCD, independente do tempo de refrigeração. A opacidade das pastas nos amidos de trigo e milho normal aumentou na presença de βCD após 10 dias de refrigeração. O aumento na tendência à retrogradação na pasta de amido de trigo com βCD está de acordo com a redução na transparência do gel deste amido. Porém outros fatores podem ter interferido na transparência das pastas de amido, uma vez que ela também reduziu na pasta de amido de

milho ceroso, mesmo tendo este amido apresentado aumento no *setback* de 42,9 para 44,6 RVU (Tabela 7) e redução na sinérese de 0,06 para 0,01% (Tabela 8), quando na presença de β CD.

Não houve alteração nas pastas de amido de milho com alto teor de amilose com e sem β CD, independente do tempo de refrigeração, porque a temperatura utilizada para preparar o gel não foi suficiente para gelatinizar a maioria dos grânulos desse amido.

5.3 EFEITO DO MONOESTEARATO DE GLICEROL (GMS) NAS PROPRIEDADES DOS AMIDOS DE CEREAIS COM E SEM β -CICLODEXTRINA

5.3.1 Amilose lixiviada

As porcentagens de amilose lixiviada em diferentes temperaturas dos amidos de trigo e milho normal adicionados de GMS (1, 2, e 3% p/v), com ou sem 3% β CD, estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10- Teor de amilose lixiviada, em diferentes temperaturas, dos amidos de trigo e milho normal adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.

Concentração de GMS (%) sem e com β CD	Amilose lixiviada (%) ¹		
	75 °C	85 °C	95 °C
Amido de trigo			
0	15,34 ± 0,43 ^{Ab}	26,78 ± 0,10 ^{Aa}	>100
1	1,50 ± 0,05 ^{Dc}	2,30 ± 0,09 ^{Eb}	13,34 ± 0,10 ^{Ba}
2	1,54 ± 0,03 ^{Dc}	2,82 ± 0,07 ^{Db}	13,24 ± 0,19 ^{Ba}
3	0,83 ± 0,02 ^{Ec}	2,87 ± 0,02 ^{CDb}	12,26 ± 0,10 ^{Ca}
1 + β CD	2,06 ± 0,08 ^{Cc}	3,20 ± 0,14 ^{BCb}	14,44 ± 0,05 ^{Aa}
2 + β CD	2,54 ± 0,09 ^{Bc}	3,00 ± 0,09 ^{CDb}	12,48 ± 0,01 ^{Ca}
3 + β CD	0,45 ± 0,01 ^{Fc}	3,31 ± 0,97 ^{Bb}	9,01 ± 0,26 ^{Da}
Amido de milho normal			
0	15,37 ± 0,17 ^{Ab}	53,32 ± 0,45 ^{Aa}	>100
1	3,54 ± 0,07 ^{Cc}	11,69 ± 0,02 ^{Bb}	39,62 ± 0,24 ^{Aa}
2	2,64 ± 0,12 ^{Dc}	11,74 ± 0,18 ^{Bb}	26,61 ± 0,18 ^{Ba}
3	1,32 ± 0,01 ^{Ec}	10,09 ± 0,11 ^{Db}	21,10 ± 0,06 ^{Da}
1 + β CD	4,78 ± 0,14 ^{Bc}	11,05 ± 0,06 ^{Cb}	39,14 ± 0,10 ^{Aa}
2 + β CD	3,23 ± 0,03 ^{Cc}	11,96 ± 0,14 ^{Bb}	26,50 ± 0,22 ^{Ba}
3 + β CD	1,30 ± 0,03 ^{Ec}	11,88 ± 0,08 ^{Bb}	23,77 ± 0,45 ^{Ca}

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Houve para todos os amidos redução no teor de amilose lixiviada quando GMS, na presença ou não de β CD, foi adicionado independente da concentração, devido à formação do complexo entre a amilose e este lipídio.

A 65 °C (dados não mostrados), com o início da gelatinização, o amido de trigo não mostrou amilose lixiviada quando GMS ou GMS na presença de β CD foram adicionados. Nas demais temperaturas, de um modo geral, houve redução progressiva no teor de amilose lixiviada quando a concentração de GMS aumentou, indicando que a quantidade de GMS utilizada não provocou a saturação da amilose. Eliasson (1994) relatou que para cada cadeia de monoacil era necessário pelo menos 18 unidades de glicose para se complexar o que corresponderia à saturação da amilose em aproximadamente 10 g de lipídio por 100 g de amilose, ou seja, o equivalente a 2,5% de lipídio adicionado. No entanto, esses resultados sugerem que a quantidade de até 2% de GMS utilizada neste trabalho, não provocou a saturação da amilose dos amidos de trigo e milho normal. Estudos têm relatado que a formação do complexo amilose-lipídio previne a lixiviação das moléculas de amilose durante a gelatinização devido a formação do complexo amilose-lipídio (ELIASSON; KRONG, 1985; TANG; COPELAND, 2007). Cui e Oates (1999) avaliaram a interação entre lipídios com diferentes comprimentos de cadeia carbônica e o amido de sago na formação de complexos amilose-lipídios, e relataram que a formação do complexo restringe o inchamento do grânulo de amido e a amilose lixiviada durante o aquecimento. Chang, He e Huang (2013b) avaliaram a influência dos métodos de adição de ácido graxo e temperatura de incubação na produção do complexo de amido de milho-ácido láurico e relataram que a adição do ácido láurico antes do aquecimento pode inibir a desintegração do grânulo, pois forma o complexo na superfície do mesmo retardando o transporte de água dentro do grânulo e a lixiviação da amilose.

A 85 °C, o amido de trigo apresentou quase a metade da porcentagem de amilose do amido de milho normal. Esses resultados ocorreram porque o amido de trigo possui maior teor de lipídios que o amido de milho, 0,75 e 0,41%, respectivamente (Tabela 2), os quais são constituídos na sua maioria por lisofosfolipídios que são muito suscetíveis a se complexar com amilose. O alto valor de amilose lixiviada do amido de milho normal em relação ao trigo (53,36% e 26,78%, respectivamente) a 85 °C, também indicou que alguns grânulos estão se rompendo devido a maior fragilidade deste amido. Os valores de amilose lixiviada dos amidos nativos de trigo e milho normal estão próximos aos encontrados por Gunaratne e Corke (2007).

A presença de β CD aumentou o teor de amilose lixiviada no amido de trigo adicionado de GMS, sugerindo que a β CD provocou uma ruptura do complexo amilose-lipídio,

complexando com o GMS e liberando moléculas de amilose, como também observado para o amido de trigo nativo e complexo amilose-lipídio natural deste amido. Gunaratne e Corke (2007) ao trabalhar com amidos de trigo, milho, batata, batata doce e arroz e Kim e Hill (1984) que trabalharam com farinha e amido de trigo observaram resultados semelhantes e sugeriram a ruptura do complexo amilose-lipídio pela β CD.

No amido de milho normal, o teor de amilose lixiviada também reduziu expressivamente com a adição de GMS, porém em menor extensão que para o amido de trigo. No caso do amido de trigo, houve uma redução de aproximadamente 92% no teor de amilose lixiviada quando GMS foi adicionado, enquanto que no amido de milho essa redução ficou próxima a 78%, a 85 °C. Do mesmo modo que para o amido de trigo, o teor de amilose lixiviada reduziu com o aumento da concentração de GMS. A presença de β CD neste amido com GMS provocou o aumento da amilose lixiviada apenas quando 3% de GMS foi usado a 85 e 95 °C.

As porcentagens de amilose lixiviada dos amidos nativos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de GMS (1, 2, e 3% p/v), com ou sem 3% β CD, estão apresentados na Tabela 11.

No caso do amido de milho ceroso, a 65 °C (dados não mostrados), não foi observada qualquer concentração de amilose lixiviada, uma vez que as temperaturas iniciais de gelatinização (T_i de 69,5 °C) deste amido são superiores à esta. A concentração de amilose lixiviada apresentada para o amido ceroso se deve ao seu baixo teor de amilose (1,10%) (Tabela 4), possivelmente porque cadeias longas de amilopectina podem ter se complexado com o iodo formando coloração azul superestimando desta maneira o valor de amilose lixiviada. Houve também redução no teor de amilose lixiviada com a adição de GMS sugerindo que houve formação de complexo das poucas moléculas de amilose e das longas cadeias ramificadas da amilopectina com o lipídio adicionado. A adição de β CD aumentou o teor de amilose lixiviada quando 2 e 3% de GMS estava presente sugerindo que também nesse caso pode ter havido ruptura do complexo amilose-lipídio.

Tabela 11- Teor de amilose lixiviada, em diferentes temperaturas, dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.

Concentração de GMS (%) sem e com β CD	Amilose lixiviada (%)		
	75 °C	85 °C	95 °C
Amido de milho ceroso			
0	1,88 ± 0,04 ^{Ac}	2,56 ± 0,05 ^{Ab}	4,44 ± 0,06 ^{Aa}
1	0,43 ± 0,02 ^{Bc}	1,83 ± 0,06 ^{Bb}	4,36 ± 0,07 ^{Aa}
2	0,30 ± 0,02 ^{Cc}	0,67 ± 0,02 ^{Db}	2,84 ± 0,06 ^{Ca}
3	0,20 ± 0,01 ^{Dc}	0,59 ± 0,02 ^{Db}	2,87 ± 0,14 ^{Ca}
1 + β CD	0,27 ± 0,01 ^{Cc}	1,77 ± 0,04 ^{Bb}	2,95 ± 0,12 ^{BCa}
2 + β CD	0,23 ± 0,01 ^{Dc}	1,13 ± 0,04 ^{Cb}	2,94 ± 0,05 ^{BCa}
3 + β CD	0,20 ± 0,03 ^{Dc}	1,13 ± 0,03 ^{Cb}	3,12 ± 0,03 ^{Ba}
Amido de milho c/ alto teor de amilose			
0	3,56 ± 0,16 ^{Ac}	16,23 ± 0,04 ^{Ab}	23,89 ± 0,42 ^{Aa}
1	0,81 ± 0,02 ^{Bc}	5,50 ± 0,06 ^{Bb}	11,36 ± 0,36 ^{Ca}
2	0,31 ± 0,01 ^{Dc}	4,40 ± 0,04 ^{Db}	11,15 ± 0,09 ^{Ca}
3	0,31 ± 0,01 ^{Dc}	4,53 ± 0,07 ^{Db}	8,95 ± 0,13 ^{Ea}
1 + β CD	0,59 ± 0,01 ^{Cc}	5,47 ± 0,15 ^{Bb}	15,78 ± 0,05 ^{Ba}
2 + β CD	0,57 ± 0,01 ^{Cc}	5,18 ± 0,02 ^{Cb}	9,84 ± 0,03 ^{Da}
3 + β CD	0,31 ± 0,02 ^{Dc}	5,43 ± 0,10 ^{BCb}	10,14 ± 0,05 ^{Da}

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O teor de amilose lixiviada no amido de milho com alto teor de amilose também reduziu progressivamente com o aumento da concentração de GMS. No entanto, esta redução foi menos expressiva que aquela observada para os amidos de milho normal e trigo, devido as maiores temperaturas de gelatinização do amido de milho com alto teor de amilose. O teor de amilose lixiviada deste amido foi reduzido em aproximadamente 65% quando 1% de GMS foi adicionado, abaixo dos valores observados para os amidos de trigo (91%) e milho normal (78%). Navarro, Martino e Zaritzky (1996), também, relataram a redução da amilose lixiviada com adição de GMS durante o aquecimento de amidos de trigo, milho normal e milho ceroso, devido à complexação entre a amilose ou amilopectina e o lipídio adicionado.

A adição de β CD também aumentou o teor de amilose lixiviada neste amido, assim como observado para os outros amidos. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os observados por Gunaratne e Corke (2007 e 2008) e Kim e Hill (1984). Esses

autores relataram que a β CD provocou o rompimento do complexo amilose-lipídio, alterando as propriedades de amilose lixiviada e propriedades de pasta dos amidos de cereais.

5.3.2 Fator de expansão e solubilidade

O fator de expansão (FE) em diferentes temperaturas e a solubilidade a 80 °C dos amidos de trigo e milho normal adicionados de GMS (1, 2, e 3% p/v), sem ou com 3% β CD, estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12- Fator de expansão¹ em diferentes temperaturas e solubilidade¹ a 80°C dos amidos de trigo e milho normal adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.

Concentração de GMS (%) sem e com β CD	Fator de Expansão				Solubilidade a 80 °C
	65 °C	75 °C	85 °C	95 °C	
Amido de trigo					
0	13,19 ± 0,10 ^{Ed}	17,50 ± 0,50 ^{Dc}	20,38 ± 0,87 ^{Bb}	28,85 ± 0,20 ^{Ca}	2,07 ± 0,07 ^A
1	14,41 ± 0,30 ^{DEc}	19,28 ± 0,64 ^{Cb}	20,36 ± 0,92 ^{Bb}	31,38 ± 0,53 ^{Ba}	1,02 ± 0,04 ^B
2	15,38 ± 0,52 ^{Dd}	22,71 ± 0,92 ^{Bc}	29,58 ± 0,60 ^{Ab}	33,92 ± 0,10 ^{Aa}	0,85 ± 0,04 ^C
3	17,44 ± 0,61 ^{Cd}	23,17 ± 0,02 ^{Bc}	30,94 ± 0,13 ^{Ab}	34,62 ± 0,82 ^{Aa}	0,33 ± 0,00 ^D
1 + β CD	18,38 ± 0,66 ^{BCc}	19,67 ± 0,30 ^{Cbc}	20,30 ± 0,45 ^{Bb}	30,89 ± 0,12 ^{Ba}	1,91 ± 0,04 ^B
2 + β CD	19,67 ± 0,36 ^{ABd}	25,40 ± 0,60 ^{Ac}	30,69 ± 0,60 ^{Ab}	33,48 ± 0,34 ^{Aa}	1,34 ± 0,04 ^C
3 + β CD	20,22 ± 0,30 ^{Ad}	25,99 ± 0,04 ^{Ac}	31,02 ± 0,78 ^{Ab}	34,02 ± 0,17 ^{Aa}	0,89 ± 0,04 ^D
Amido de milho normal					
0	16,63 ± 0,25 ^{Ad}	18,27 ± 0,70 ^{Ac}	20,80 ± 0,64 ^{Ab}	22,39 ± 0,40 ^{Aa}	2,88 ± 0,09 ^A
1	10,63 ± 0,49 ^{Bd}	14,31 ± 0,02 ^{Bc}	16,41 ± 0,60 ^{BCb}	19,61 ± 0,02 ^{BCa}	1,58 ± 0,05 ^B
2	10,92 ± 0,10 ^{Bc}	13,48 ± 0,47 ^{Bb}	15,17 ± 0,73 ^{Cb}	17,57 ± 0,50 ^{DEa}	1,24 ± 0,05 ^C
3	11,09 ± 0,13 ^{Bb}	11,74 ± 0,41 ^{Cb}	16,87 ± 0,64 ^{Ba}	17,16 ± 0,20 ^{Ea}	1,12 ± 0,04 ^C
1 + β CD	9,40 ± 0,24 ^{Cc}	14,35 ± 0,33 ^{Bb}	15,07 ± 0,41 ^{Cb}	18,67 ± 0,02 ^{BCa}	5,36 ± 0,13 ^B
2 + β CD	9,29 ± 0,36 ^{Cd}	13,89 ± 0,17 ^{Bc}	15,77 ± 0,37 ^{BCb}	18,36 ± 0,10 ^{CDa}	4,45 ± 0,19 ^C
3 + β CD	8,93 ± 0,24 ^{Cd}	12,99 ± 0,24 ^{BCc}	15,34 ± 0,52 ^{BCb}	18,07 ± 0,10 ^{Da}	4,71 ± 0,07 ^C

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey ($p \leq 0.05$).

O FE aumentou progressivamente no amido de trigo com o aumento da concentração de GMS (Tabela 12), devido à complexação entre a amilose e este emulsificante, liberando as moléculas de amilopectina que incharam mais livremente, aumentando o FE e reduzindo o teor

de amilose lixiviada neste amido, como observado anteriormente. A adição da β CD provocou um significativo aumento no FE e na solubilidade do amido de trigo, provavelmente devido ao fato da β CD ter provocado o rompimento do complexo amilose-lipídio com consequente complexação com os lipídios.

Ao contrário do trigo, o amido de milho normal apresentou redução do FE e da solubilidade com adição de GMS e/ou da β CD em cada uma das temperaturas estudadas (Tabela 12). Possivelmente o menor teor de lipídios (0,41%), além do tipo de lipídio presente e o tamanho molecular da molécula de amilose interferiram no inchamento do grânulo desse amido. Os lipídios do amido de milho são compostos principalmente de ácidos graxos livres, enquanto o amido de trigo contém principalmente lisofosfolipídios (BULÉON et al., 1998). Alguns autores também relataram diferença entre o tamanho das moléculas de amilose dos amidos de trigo e milho normal, Chung e Liu (2009) encontraram GP de 1244 unidades de glicose na amilose do amido de milho, enquanto Ong et al. (1994) observaram GP de 3827 na amilose do amido de trigo.

O fator de expansão (FE) em diferentes temperaturas e a solubilidade a 80 °C dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de GMS (1, 2, e 3% p/v), com ou sem 3% β CD, estão apresentadas na Tabela 13.

A solubilidade do amido de milho ceroso reduziu com adição de GMS, apesar do baixo teor de amilose e de lipídios neste amido (1,10% e 0,12%, respectivamente). O FE do amido de milho ceroso aumentou levemente com o aumento da concentração de GMS, uma vez que, o inchamento do grânulo é principalmente uma propriedade da amilopectina e a amilose é responsável por manter as moléculas de amilopectina unidas durante o inchamento, e por consequente, a integridade dos grânulos (TESTER; MORISON, 1990). Isso explica os maiores valores de FE deste amido independente da presença de GMS e/ou β CD. No entanto, após a adição da β CD na presença do GMS houve uma leve redução a 85 e 95 °C do FE no amido de milho ceroso, apesar do baixo teor de amilose e de lipídios neste amido.

Tabela 13- Fator de expansão¹ em diferentes temperaturas e solubilidade¹ a 80°C do amido de milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de βCD.

Concentração de GMS (%) sem e com βCD	Fator de Expansão				Solubilidade a 80 °C
	65 °C	75 °C	85 °C	95 °C	
Amido de milho ceroso					
0	20,34 ± 0,15 ^{Dd}	24,79 ± 0,42 ^{Ec}	33,16 ± 0,81 ^{Db}	35,21 ± 0,10 ^{Da}	1,38 ± 0,05 ^A
1	22,97 ± 0,03 ^{Cd}	31,29 ± 0,23 ^{Dc}	43,56 ± 0,81 ^{Ab}	45,18 ± 0,20 ^{Ba}	0,99 ± 0,04 ^B
2	24,87 ± 0,10 ^{Bc}	32,83 ± 0,39 ^{BCb}	44,24 ± 1,03 ^{Aa}	45,89 ± 0,20 ^{ABa}	0,97 ± 0,04 ^B
3	24,26 ± 0,16 ^{Bd}	34,40 ± 0,82 ^{ABc}	44,00 ± 0,84 ^{Ab}	46,53 ± 0,17 ^{Aa}	0,94 ± 0,00 ^B
1 + βCD	26,21 ± 0,23 ^{Ad}	31,76 ± 0,30 ^{CDc}	36,55 ± 0,70 ^{Cb}	38,84 ± 0,38 ^{Ca}	4,13 ± 0,05 ^B
2 + βCD	26,47 ± 0,40 ^{Ac}	34,25 ± 0,25 ^{ABb}	40,35 ± 0,70 ^{Ba}	39,17 ± 0,45 ^{Ca}	4,10 ± 0,04 ^B
3 + βCD	26,39 ± 0,27 ^{Ac}	36,06 ± 1,31 ^{Ab}	41,05 ± 0,80 ^{Ba}	39,07 ± 0,13 ^{Ca}	4,10 ± 0,00 ^B
Amido de milho c/ alto teor de amilose					
0	1,94 ± 0,03 ^{Dc}	2,30 ± 0,10 ^{Ec}	5,00 ± 0,10 ^{Cb}	6,28 ± 0,20 ^{Ca}	1,27 ± 0,00 ^A
1	2,78 ± 0,04 ^{Bd}	5,31 ± 0,10 ^{Ac}	6,78 ± 0,30 ^{Bb}	7,68 ± 0,18 ^{Ba}	1,05 ± 0,04 ^B
2	3,00 ± 0,01 ^{Ad}	4,64 ± 0,01 ^{Bc}	6,41 ± 0,13 ^{Bb}	8,51 ± 0,10 ^{Aa}	1,03 ± 0,04 ^B
3	2,46 ± 0,10 ^{Cc}	3,58 ± 0,03 ^{Cb}	3,64 ± 0,04 ^{Db}	6,64 ± 0,05 ^{Ca}	1,01 ± 0,00 ^B
1 + βCD	2,48 ± 0,10 ^{Cd}	5,56 ± 0,15 ^{Ac}	9,01 ± 0,08 ^{Aa}	7,67 ± 0,12 ^{Bb}	4,39 ± 0,14 ^A
2 + βCD	2,03 ± 0,07 ^{Dd}	2,80 ± 0,05 ^{Dc}	3,42 ± 0,10 ^{Db}	7,89 ± 0,10 ^{Ba}	4,41 ± 0,04 ^A
3 + βCD	1,15 ± 0,04 ^{Ed}	2,85 ± 0,11 ^{Dc}	3,61 ± 0,11 ^{Db}	5,53 ± 0,10 ^{Da}	4,30 ± 0,07 ^A

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05).

O FE do amido de milho com alto teor de amilose aumentou quando GMS foi usado, no entanto, acima de 1% de GMS reduziu. O baixo efeito dessa interação amilose-GMS pode ser devido a maiores temperaturas de gelatinização (Tp de 85,7 °C, Figura 14, A, IV, a) desse amido. Assim como ocorreu nos amidos de trigo, a solubilidade do amido de milho com alto teor de amilose reduziu com o aumento da concentração de GMS. De um modo geral, a adição de βCD provocou redução do FE do amido de milho com alto teor de amilose.

5.3.3 Propriedades de pasta

Os perfis viscoamilográficos das propriedades de pasta dos amidos de trigo e milho normal adicionados de GMS (1, 2, e 3% p/v), com ou sem 3% de β CD, determinadas através de RVA, estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

A temperatura de pasta do amido de trigo aumentou com a adição de GMS (de 91,5 para 95,0 °C) independente da concentração de GMS. A viscosidade de pico aumentou atingindo 244,2 RVU na presença de 3% GMS, sendo que as concentrações de 2 e 3% não apresentaram diferença significativa, sugerindo que 2% de GMS foi quantidade suficiente para, junto com os lisofosfolípidios naturais do amido, se complexarem com toda a amilose disponível para complexação. A viscosidade de quebra reduziu com adição de GMS, enquanto a viscosidade final reduziu significativamente somente com a adição de 2% de GMS. No entanto, a tendência a retrogradação reduziu significativamente com o aumento da concentração de GMS. Um aumento abrupto da viscosidade foi observado por volta de 70 °C na etapa de resfriamento, independente da concentração (Figura 15, a). Resultados semelhantes foram observados por Putseys et al. (2010) para o amido de trigo. Esses autores sugeriram que o GMS adsorve na superfície do grânulo, impedindo a absorção de água e como consequência o empastamento. O aumento abrupto na viscosidade observado na etapa de resfriamento foi devido à complexação do GMS com a amilose.

A adição da β CD no amido de trigo adicionado de GMS provocou redução da viscosidade de pico atingindo 189,8 RVU e um leve aumento da viscosidade de quebra e *setback* atingindo 11, 8 e 167,7 RVU, respectivamente, quando na presença de 1% de GMS. Estes resultados sugeriram que possivelmente a β CD pode competir com a amilose para complexação. Conforme sugerido por Tian et al. (2010), a β CD pode interagir diretamente com a amilose para formar o complexo amilose- β CD-lipídio.

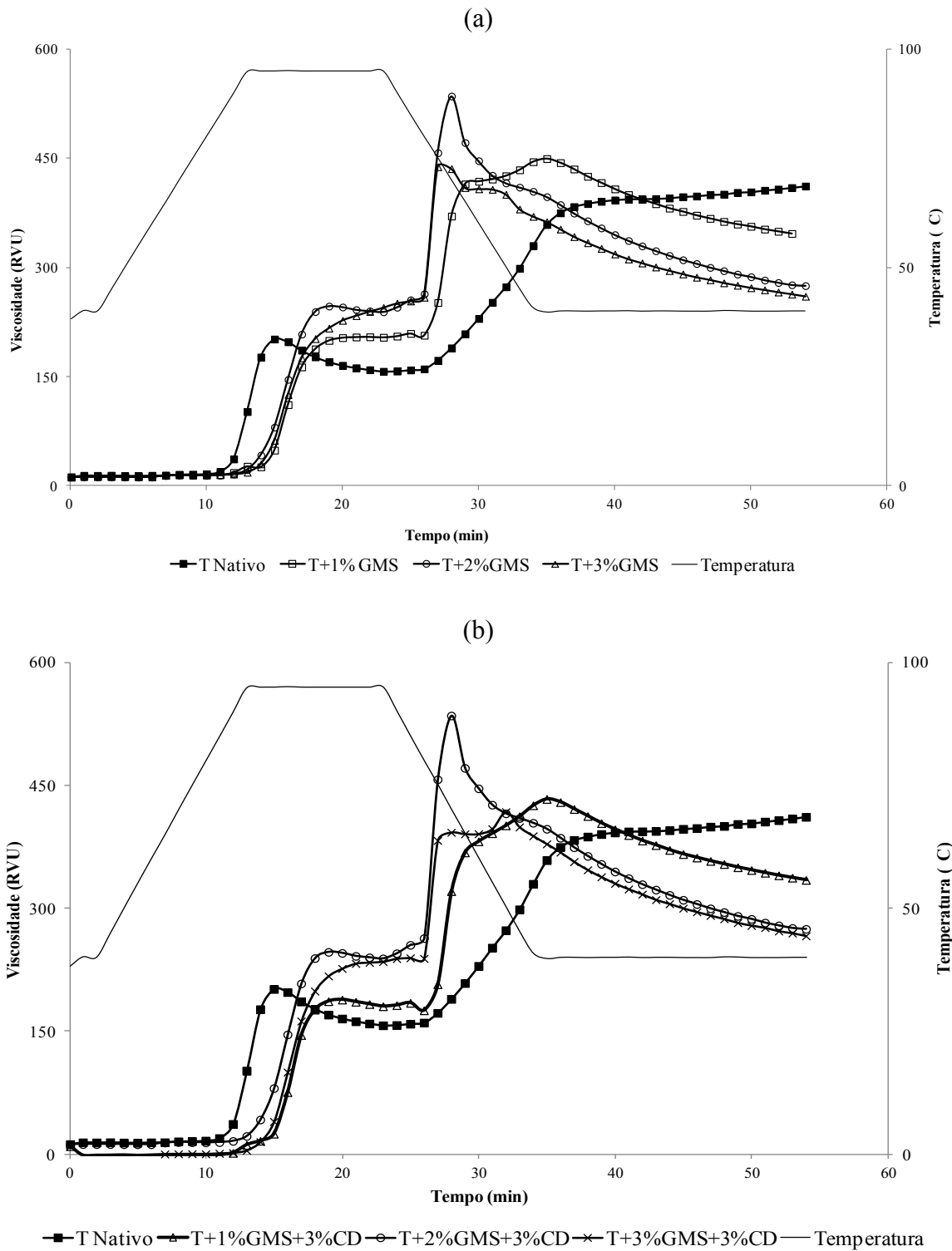


Figura 15: Perfil viscoamilográfico do amido de trigo adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem (a) e com 3% de β CD (b).

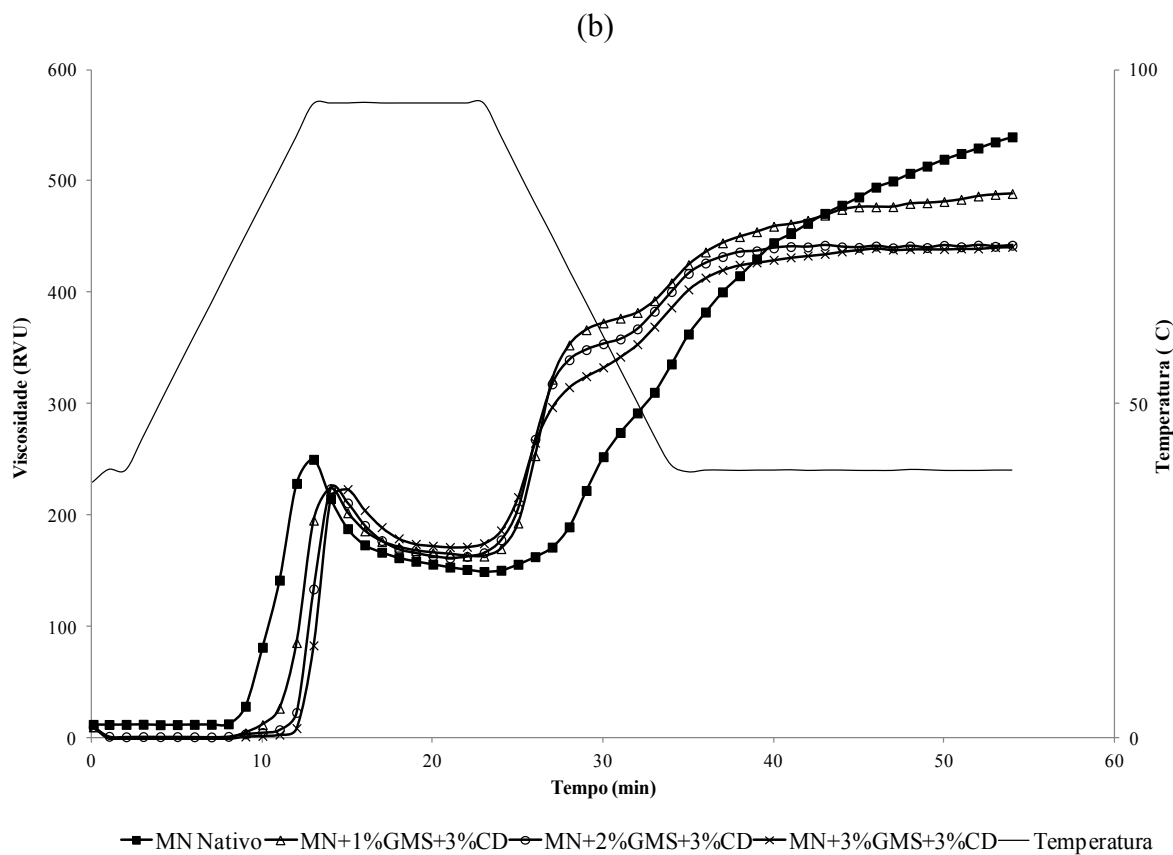
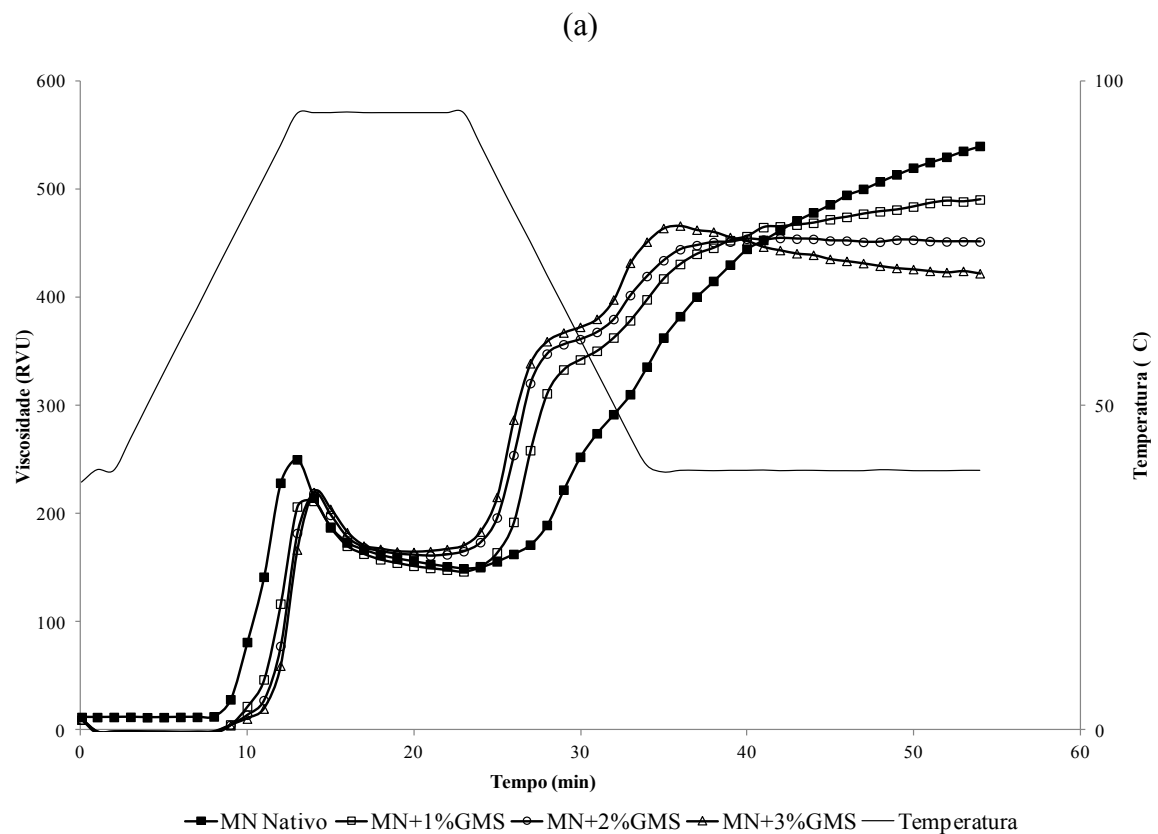


Figura 16: Perfil viscoamilográfico do amido de milho normal adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem (a) e com 3% de β CD (b).

No amido de milho normal a temperatura de pasta aumentou gradativamente com o aumento da concentração de GMS. A viscosidade de pico reduziu com a adição de emulsificante, no entanto, o aumento na concentração de GMS não foi significativo. A viscosidade de quebra reduziu gradativamente até 2% de GMS, enquanto a viscosidade final e o *setback* reduziram significativamente com o aumento na concentração de GMS. A redução das viscosidades de pico e de quebra sugeriu a formação do complexo amilose-GMS que provocou enrijecimento das cadeias de amilose, inibindo o inchamento do grânulo e a lixiviação da amilose durante a gelatinização. A concentração de 1% de GMS foi suficiente para saturar a amilose no amido de milho normal.

A redução da viscosidade de quebra nos amidos de trigo e milho normal após a adição do GMS indica que esses amidos se tornaram mais resistentes ao aquecimento e ao cisalhamento, produzindo pastas mais estáveis.

A β CD não alterou as viscosidades de pico e quebra do amido de milho normal adicionado de GMS. No entanto, a viscosidade final foi reduzida e o *setback* aumentou atingindo 490,0 e 328,7 RVU, respectivamente, quando na presença de 1% de GMS, sugerindo que a β CD interferiu nos complexos deste amido de maneira menos intensa que no trigo.

Estes resultados sugerem que em concentrações acima de 1% de GMS a adição da β CD não alterou as propriedades de pasta dos amidos de trigo e milho normal, sugerindo que o excesso do emulsificante favoreceu uma maior afinidade da β CD pelo GMS.

Algumas diferenças observadas no comportamento da pasta após a adição de GMS para os amidos de trigo e milho normal podem ser atribuídas à diferença na organização do grânulo, as diferenças estruturais das moléculas de amilose, e, a maneira como estas cadeias estão posicionadas e localizadas no grânulo de amido.

Estudos têm revelado que a extensão do comprimento da cadeia e a presença de uma cabeça polar carregada na molécula do emulsificante têm influência direta nas propriedades de pasta e no poder de inchamento dos grânulos de amido, conforme observado por alguns autores (AZIZI; RAO, 2005; KRONG, 1973; MIRA; ELIASSON; PERSSON, 2005). O GMS é um ácido esteárico de 18 carbonos, esterificado com glicerol, e, pode ser considerado um monoacil sem carga. Mira, Persson e Villwock (2007) em estudo avaliando a influência de emulsificantes com diferentes comprimentos de cadeias (curtas e longas) e iônicos e não iônicos em amidos de trigo normal e ceroso, observaram que todos os emulsificantes de cadeia longa aumentaram a viscosidade de pico do amido de trigo normal, enquanto que para o amido de trigo ceroso, o que influenciou foi à presença de emulsificantes iônicos.

As propriedades de pasta dos amidos de milho ceroso e com alto teor de amilose adicionados de GMS (1, 2, e 3% p/v), com ou sem 3% de β CD estão mostradas nas Figuras 17 e 18.

A adição do GMS não alterou significativamente a temperatura de pasta do amido de milho ceroso. As viscosidades de pico e quebra aumentaram com a adição de até 2% de emulsificante (363,3 e 252,9 RVU, respectivamente). Não foi observada alteração significativa após a adição de diferentes concentrações de GMS na viscosidade final, no entanto, o *setback* reduziu significativamente com o aumento na concentração de GMS atingindo 20,3 RVU quando na presença de 3% de GMS, provavelmente devido à dificuldade de retrogradação das poucas moléculas de amilose possivelmente complexadas. A falta de amilose e a estrutura interna fracamente ligada no amido de milho ceroso possivelmente contribuíram para o aumento nas viscosidades de pasta do amido de milho ceroso. A adição da β CD não alterou a temperatura de pasta, mas as viscosidades de pico, quebra e final reduziram atingindo 358,5, 243,1 e 141,1 RVU, respectivamente, e o *setback* foi levemente aumentado.

No caso do amido com alto teor de amilose, as cadeias de amilose densamente empacotadas preveniram tanto a penetração da água quanto do emulsificante ou da β CD mostrando dados de viscosidades tão baixos que estão dentro da margem de erro do aparelho e por isso não podem ser discutidos.

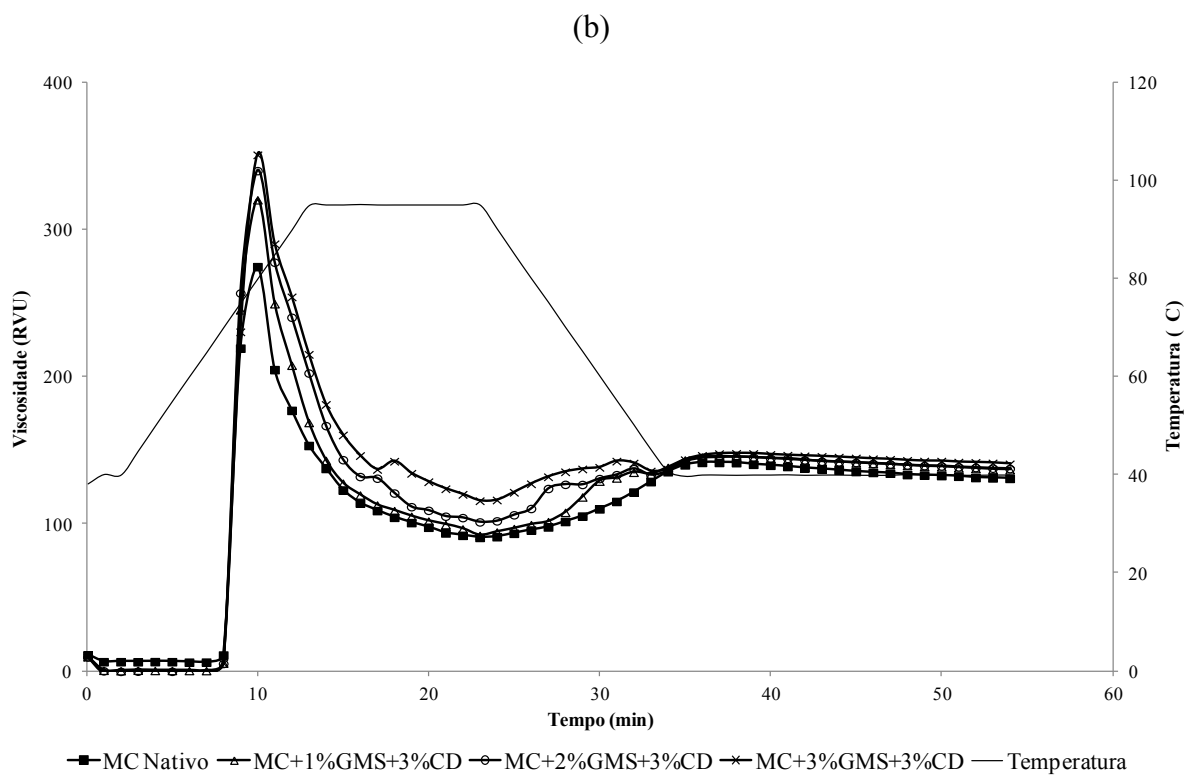
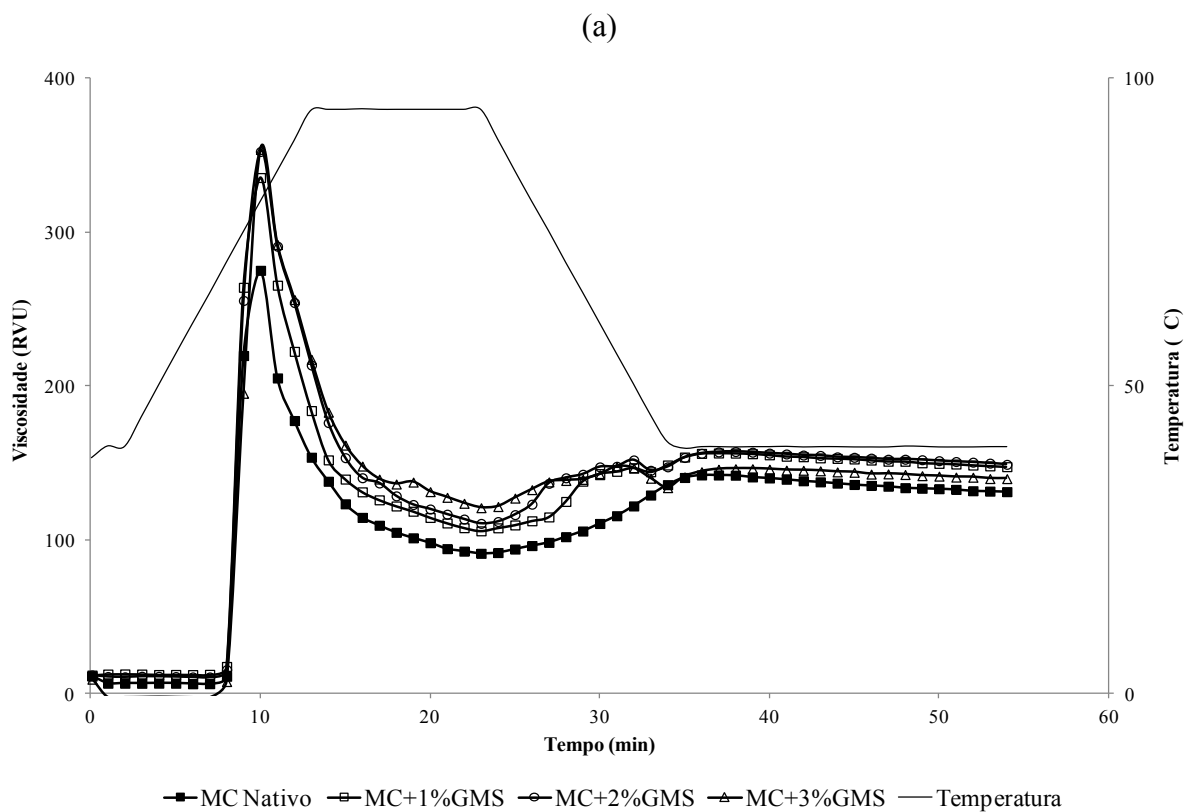


Figura 17: Perfil viscoamiliográfico do amido de milho ceroso adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.

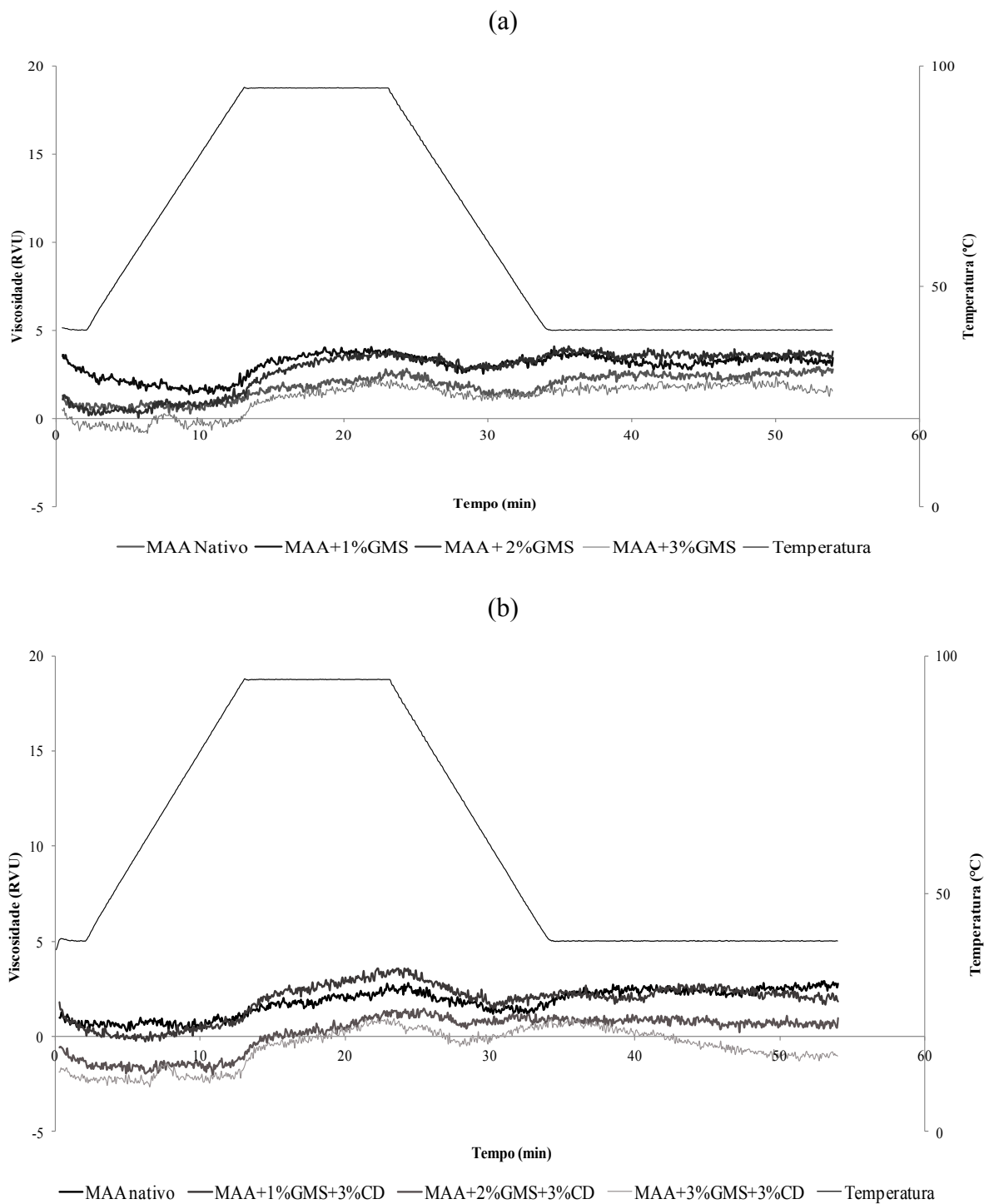


Figura 18– Perfil viscoamlográfico do amido de milho alta amilose adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD.

5.3.4 Propriedades térmicas

As curvas de DSC dos amidos nativos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD estão apresentadas na Figura 19.

No ciclo de aquecimento (A), os termogramas mostram os picos de gelatinização do amido e de dissociação dos complexos amilose-lipídios, exceto para os amidos de milho ceroso (Figura 19, III, a) e de milho com alto teor de amilose (Figura 19, IV, a) que não mostraram este último pico, como já discutido anteriormente (item 5.2.4). Um leve pico (~ 55 °C) antes do pico de gelatinização, que correspondeu à fusão do GMS foi observado para todos os amidos adicionados deste emulsificante. Nos termogramas do amido de trigo adicionado de GMS (Figura 19, I b, c, d) este pico estava sobreposto ao pico de gelatinização, devido a menores temperaturas de gelatinização do amido de trigo, enquanto que nos demais amidos ele foi observado antes do pico de gelatinização.

A adição do GMS praticamente não alterou as temperaturas de gelatinização dos amidos estudados e provocou uma leve redução de aproximadamente 6,2% na entalpia para todos os amidos, principalmente quando 3% de GMS foi usado, exceto para o amido de milho ceroso onde a entalpia não foi alterada. Estes dados contrariaram aqueles reportados por Eliasson (1994) e Debet e Gildley (2006), que relataram aumentos de 1 a 3 °C nas temperaturas de gelatinização de amidos na presença de emulsificante. Kaur et al. (2005) também relataram aumento da temperatura de gelatinização do amido de milho normal e batata após adição de GMS, e sugeriram que os complexos formados amilose-GMS restringiram o inchamento dos grânulos e causaram atraso da temperatura de gelatinização dos amidos.

Com a adição da β CD foi observado um pico a aproximadamente 100 °C para todos os amidos, o qual provavelmente correspondeu à dissociação da β CD, visto que houve alteração na linha de base do pico, o que não é característico dos complexos amido-lipídios. A adição da β CD nos diferentes amidos adicionados de GMS não alterou as temperaturas de gelatinização e entalpia, com exceção do amido de milho com alto teor de amilose (Figura 19 A, I, II, III, IV) que mostrou um aumento significativo do ΔH_{cx} atingindo 18,11 J/g. Esse aumento do ΔH_{cx} sugere uma possível associação entre o GMS e a β CD.

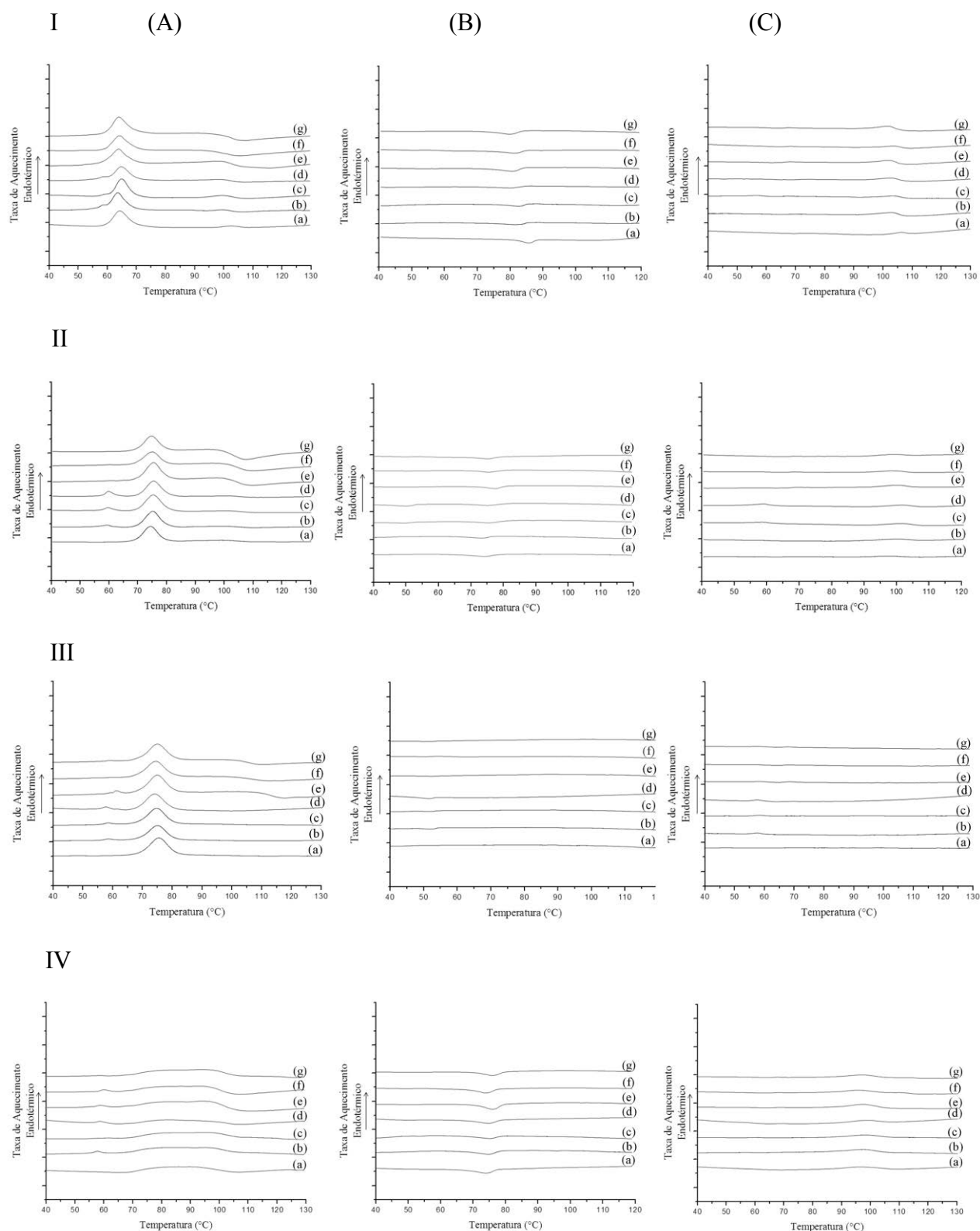


Figura 19: Perfil endotérmico dos amidos: I: trigo, II: milho normal, III: milho ceroso e IV: milho com alto teor de amilose adicionado de GMS sem e com β CD, (a) amido nativo, (b) 1% GMS, (c) 2% GMS, (d) 3% GMS; (e) 1% GMS e 3% de β CD, (f) 2% GMS e 3% de β CD, (g) 3% GMS e 3% de β CD. (A): 1° ciclo de aquecimento; (B): resfriamento; (C): 2° ciclo de aquecimento.

A temperatura e entalpia de dissociação do complexo amilose-lipídio do amido de trigo (101,49 °C e 0,99 J/g, Figura 19, A, I, a, b, c) foram maiores que as do amido de milho normal (99,86 °C e 0,89 J/g, Figura 19, A, II, a, b, c). A adição de GMS praticamente não alterou as temperaturas de dissociação dos complexos dos amidos de trigo e milho normal, porém a 3% de GMS, foi observado aumento significativo do ΔH_{cx} no amido de trigo (Figura 19, A, I, a, b, c), enquanto esse aumento foi observado já com a adição de 2% de GMS no amido de milho normal (Figura 19, A, II, b). A adição da β CD nos amidos de trigo e milho normal adicionados de GMS provocou redução nas t_{cx} e aumento nos ΔH_{cx} (Figura 19, A, I, II, d, e, f) sugerindo que a β CD interferiu na formação dos complexos amilose-GMS desses amidos.

No ciclo de resfriamento (B), os complexos foram reformados e recristalizados. O aumento da concentração de GMS não representou aumento da intensidade de complexação nos amidos de trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose (Figura 19, I, II, IV, a, b, c). Os picos exotérmicos referentes à recristalização ocorreram a temperaturas mais baixas (~75 °C) que aquelas dos picos de fusão. Como já esperado, o amido de milho ceroso não apresentou pico exotérmico referente à recristalização do complexo, porém apresentou um leve pico a aproximadamente 50 °C referente à recristalização do GMS (Figura 19, III, b, c, d). Após a adição da β CD foi observado aumento do ΔH_{cx} para os amidos de trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose (Figura 19, I, II, IV, d, e, f), indicando que possivelmente houve formação de um complexo entre amilose- β CD-GMS.

No ciclo de reaquecimento (C) houve aumento nas temperaturas e entalpia de dissociação dos complexos dos diferentes amidos, quando comparado ao primeiro aquecimento: de 99,06 para 103,1 °C, para o amido de trigo; de 99,88 para 100,54 °C para o amido milho normal, e de 85 para 98,28 °C, para o amido de milho com alto teor de amilose (Figura 19, I, II, IV, respectivamente). O ΔH_{cx} aumentou de 0,37 para 2,12 J/g, de 0,041 para 1,06 J/g, e de 1,45 para 2,27 J/g nos amidos de trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose adicionados de 1% de GMS, respectivamente. Segundo Eliasson (1994) se uma amostra de amido-lipídio é aquecida, resfriada e novamente aquecida no DSC, maiores valores de entalpia são normalmente obtidos durante a segunda corrida em função das melhores condições para formação do complexo após o primeiro aquecimento. O amido de milho normal adicionado de 3% de GMS mostrou um leve pico a temperaturas inferiores (50-60 °C) àquelas da dissociação do complexo. Este pico correspondeu à dissociação do GMS. No entanto, para o amido de trigo não foi observado este pico de dissociação do GMS, sugerindo que a formação do complexo, neste amido, foi mais intensa. Após a adição da β CD um significativo aumento

do ΔH_{cx} foi observado para os amidos, provavelmente devido a maior energia necessária para dissociar o possível complexo formado entre amilose- β CD-GMS.

A ausência do pico de dissociação do complexo amido-lipídio no amido de milho ceroso adicionado de GMS (Figura 19, III, b, c, d) sugeriu que a formação de complexos entre as cadeias longas da amilopectina e o GMS ocorreu de maneira menos intensa dificultando a detecção pelo DSC. No entanto, após a síntese dos complexos, os difractogramas de raios-x mostraram que houve a formação de complexos entre as longas cadeias de amilopectina e o GMS, resultados mostrados a seguir na segunda etapa do trabalho.

Também não foi possível observar no primeiro ciclo de aquecimento, um segundo pico para o amido de milho com alto teor de amilose (Figura 19, IV), possivelmente devido à alta faixa de temperatura de gelatinização desse amido (35,9 °C).

O amido de milho ceroso nativo não apresentou pico endotérmico no ciclo de reaquecimento (Figura 19, III). Porém, com a adição de diferentes concentrações de GMS foram observados leves picos entre 50-60 °C indicando a dissociação do GMS recristalizado (Figura 19, C, III, b, c, d). Também foi observado picos após a adição da β CD no amido de milho ceroso adicionado de GMS (Figura 19, C, III e, f, g), porém estes ocorreram em temperaturas mais altas (60-70 °C) o qual possivelmente correspondeu à dissociação da β CD.

5.3.5 Sinérese

A sinérese dos géis dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD e armazenados sob refrigeração por 10 dias, estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Sinérese dos géis dos amidos de cereais adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD, refrigerados por 10 dias.

Concentração de GMS sem e com β CD (%)	Sinérese (%) ¹			
	Trigo	Milho normal	Milho ceroso	Milho c/ alto teor de amilose
0	4,09 \pm 0,1 ^a	7,09 \pm 0,28 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a	11,68 \pm 0,33 ^a
1	1,46 \pm 0,02 ^d	4,99 \pm 0,15 ^c	0,04 \pm 0,00 ^b	10,97 \pm 0,30 ^b
2	1,09 \pm 0,01 ^c	5,55 \pm 0,23 ^b	0,01 \pm 0,00 ^d	10,89 \pm 0,43 ^b
3	0,97 \pm 0,01 ^c	5,56 \pm 0,27 ^b	0,01 \pm 0,00 ^d	10,80 \pm 0,11 ^b
1 + β CD	3,61 \pm 0,04 ^a	5,32 \pm 0,02 ^{bc}	0,02 \pm 0,00 ^c	10,89 \pm 0,02 ^b
2 + β CD	2,40 \pm 0,05 ^b	5,37 \pm 0,26 ^{bc}	0,02 \pm 0,00 ^c	10,88 \pm 0,16 ^b
3 + β CD	1,87 \pm 0,04 ^c	5,76 \pm 0,23 ^b	0,02 \pm 0,00 ^c	10,46 \pm 0,59 ^b

¹Média de três determinações \pm Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Os géis frescos não apresentaram sinais de sinérese, como já era esperado. Após 10 dias de armazenamento, os amidos de trigo e de milho normal apresentaram redução de sinérese com adição de GMS. No entanto, no amido de trigo a sinérese diminuiu significativamente até 2% de GMS, enquanto no amido de milho normal a concentração de emulsificante não diferiu significativamente. Essa redução da sinérese nos amidos de trigo e milho normal está de acordo com os resultados encontrados para o *setback* (de 205 para 21 RVU no amido de trigo, e de 391 para 250 RVU no amido de milho, Figuras 15 e 16, respectivamente).

Por outro lado, a presença de β CD nos géis de amido de trigo adicionados de GMS aumentou a sinérese. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados para o *setback* deste amido quando a β CD foi adicionada (Tabela 7), sugerindo o rompimento do complexo amilose-lipídio pela β CD e a liberação da amilose neste amido. Já no amido de milho normal, a presença de β CD não alterou o comportamento da sinérese nos amidos adicionados de GMS.

Após 10 dias de refrigeração, a sinérese dos géis de amido de milho ceroso reduziu com a adição de emulsificante, sendo que não foi observada diferença significativa entre as concentrações de 2 e 3%. Os géis de amido de milho ceroso, como esperado, apresentaram sinais mínimos de sinérese, devido ao baixo teor de amilose deste amido (1,10%). Devido aos valores muito baixos de sinérese para este amido, a presença de β CD não alterou o resultado final.

Os géis de amido de milho com alto teor de amilose adicionados de GMS, após 10 dias de refrigeração, mostraram redução na sinérese. No entanto, as diferentes concentrações do

emulsificante não afetaram a saída de água do gel. Como nem todos os grânulos do amido com alto teor de amilose gelatinizaram a temperaturas menores que 95 °C, conforme observado nos resultados de propriedades térmicas (T_f 104,5 °C), o valor de sinérese pode ter sido superestimado. A adição de β CD não alterou o comportamento da sinérese nos amidos adicionados de GMS.

5.3.6 Transparência

A transparência dos géis dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, adicionados de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD e armazenados sob refrigeração por 10 dias, estão apresentados na Tabela 15.

A transparência dos géis dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose não apresentaram alteração significativa no dia em que foram preparados (dia 0), independente da adição de GMS e/ou β CD.

Após 10 dias de armazenamento sob refrigeração, a transparência dos géis dos amidos sem GMS diminuiu significativamente, refletindo o processo de retrogradação ocorrido durante o período de armazenamento. Os géis dos amidos de trigo e milho normal adicionados de GMS apresentaram aumento significativo da transparência de pasta independente da concentração de GMS, possivelmente devido à formação do complexo amilose-GMS que provocou redução do *setback* (Figuras 15 e 16), respectivamente, diminuindo a opacidade de pasta desses amidos. Kaur et al. (2005) também relataram a redução da opacidade dos géis de amido de milho normal e batata adicionados de GMS durante a estocagem sob refrigeração, isto se deu devido a presença de complexo de inclusão amido-lipídio, que atrasou a reassociação das moléculas de amilose e amilopectina durante a estocagem sob refrigeração. A adição da β CD não provocou alteração da transparência de pasta nos amidos de trigo e milho normal.

Tabela 15– Transparência¹ dos géis de amido de trigo, adicionado de 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% de β CD, refrigerados por 0 e 10 dias.

Concentração de GMS sem e com β CD (%)	Transparência (%)	
	0 dias	10 dias
Amido de trigo		
0	19,20 \pm 0,20 ^{Aa}	17,70 \pm 0,20 ^{Bb}
1	19,73 \pm 0,50 ^{Ab}	21,30 \pm 0,50 ^{Aa}
2	19,50 \pm 0,80 ^{Ab}	21,90 \pm 0,80 ^{Aa}
3	19,40 \pm 0,60 ^{Ab}	21,30 \pm 0,60 ^{Aa}
1 + β CD	19,50 \pm 0,50 ^{Ab}	21,50 \pm 0,50 ^{Aa}
2 + β CD	19,50 \pm 0,50 ^{Ab}	21,40 \pm 0,50 ^{Aa}
3 + β CD	19,30 \pm 0,40 ^{Ab}	21,20 \pm 0,40 ^{Aa}
Amido de milho normal		
0	19,14 \pm 0,40 ^{Aa}	17,00 \pm 0,40 ^{Bb}
1	19,10 \pm 0,50 ^{Ab}	21,00 \pm 0,50 ^{Aa}
2	19,20 \pm 0,20 ^{Ab}	21,10 \pm 0,30 ^{Aa}
3	19,70 \pm 0,50 ^{Ab}	21,60 \pm 0,50 ^{Aa}
1 + β CD	19,10 \pm 0,30 ^{Ab}	22,00 \pm 0,40 ^{Aa}
2 + β CD	19,90 \pm 0,40 ^{Ab}	21,70 \pm 0,40 ^{Aa}
3 + β CD	19,30 \pm 0,40 ^{Ab}	21,30 \pm 0,40 ^{Aa}
Amido de milho ceroso		
0	58,70 \pm 1,60 ^{Aa}	47,30 \pm 2,30 ^{Bb}
1	60,00 \pm 0,20 ^{Ab}	65,72 \pm 0,20 ^{Aa}
2	59,83 \pm 1,50 ^{Ab}	65,00 \pm 1,00 ^{Aa}
3	60,06 \pm 1,20 ^{Ab}	65,50 \pm 1,10 ^{Aa}
1 + β CD	61,30 \pm 1,40 ^{Ab}	67,20 \pm 0,70 ^{Aa}
2 + β CD	60,80 \pm 1,60 ^{Ab}	66,80 \pm 1,30 ^{Aa}
3 + β CD	60,20 \pm 0,80 ^{Ab}	67,30 \pm 0,40 ^{Aa}
Amido de milho c/ alto teor de amilose		
0	14,36 \pm 1,00 ^{Aa}	14,40 \pm 1,00 ^{Aa}
1	14,90 \pm 0,80 ^{Aa}	14,90 \pm 0,80 ^{Aa}
2	14,13 \pm 0,20 ^{Aa}	14,10 \pm 0,20 ^{Aa}
3	14,00 \pm 0,30 ^{Aa}	14,60 \pm 0,30 ^{Aa}
1 + β CD	14,48 \pm 0,40 ^{Aa}	14,50 \pm 0,40 ^{Aa}
2 + β CD	14,45 \pm 0,30 ^{Aa}	14,50 \pm 0,30 ^{Aa}
3 + β CD	14,00 \pm 0,60 ^{Aa}	14,00 \pm 0,60 ^{Aa}

¹Média de três determinações \pm Desvio Padrão. Letras diferentes maiúsculas na mesma coluna e minúsculas na mesma linha, para cada amido, diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Após armazenamento, a transparência de pasta do amido de milho ceroso adicionado de GMS aumentou independente da concentração. Apesar do baixo teor de amilose (1,10%) presente nesse amido, provavelmente essa amilose complexou com o GMS provocando redução do *setback*, de 42,9 para 20,3 RVU (Figura 17), e reduzindo a opacidade de pasta nesse amido. A adição de β CD não alterou o comportamento da pasta adicionada de GMS.

O amido de milho com alto teor de amilose após armazenamento sob refrigeração não apresentou alteração da transparência de pasta independente da adição de GMS sem e com β CD, provavelmente a temperatura utilizada para produzir os géis não foi suficiente para gelatinizar a maioria dos grânulos desse amido, devido sua maior temperatura de gelatinização (T_f 104,5 °C).

5.4 COMPLEXOS FORMADOS

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Nas Figuras 20, 21, 22 e 23 estão apresentadas as micrografias obtidas em MEV dos complexos sintetizados dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose, respectivamente com 1, 2 e 3% de GMS sem e com 3% β CD. Os complexos formados pelos amidos de trigo (Figura 20) e milho normal (Figura 21) com diferentes concentrações de GMS mostraram estruturas facetadas, típicas de cristais. Estruturas facetadas semelhantes também foram observadas por Exarhopoulos e Raphaelides (2012) em complexos de amidos de milho normal e ervilha com ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico e por Zabar et al. (2010) em complexos de amilose de batata com ácidos graxos saturado e insaturado.

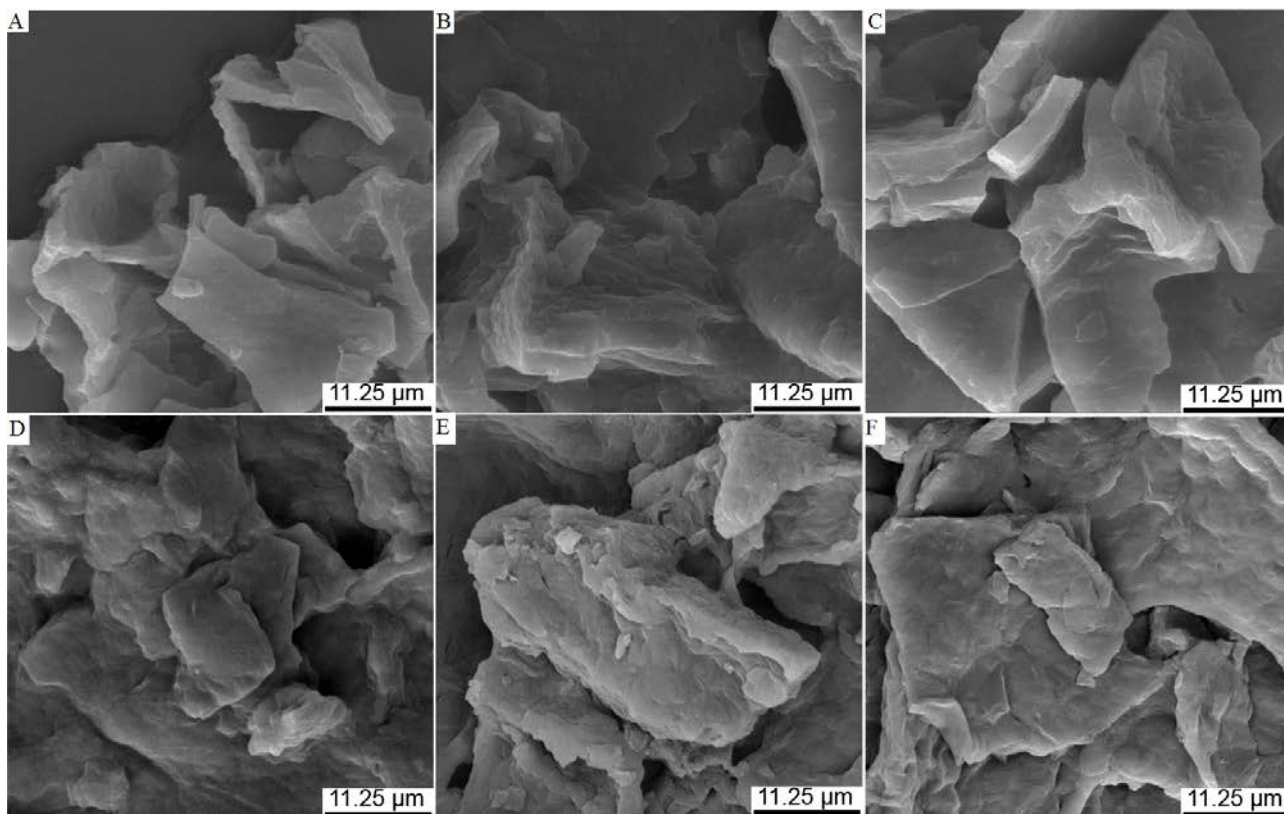


Figura 20: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de trigo com GMS sem e com β CD observados em MEV.

A: 1% de GMS; B: 2% de GMS; C: 3%GMS; D: 1% de GMS e 3% β CD; E: 2% de GMS e 3% β CD e F: 3%GMS e 3% β CD.

Análises térmicas de complexos amido-emulsificante têm revelado a existência de cristais polimórficos que apresentam temperaturas características de dissociação. Esses complexos são formados como precipitados insolúveis em meio aquoso neutro, resultando em formas facetadas cristalinas que apresentam padrão tipo “V”, quando observados em difractômetro de raios-X (BILIADERIS; SENEVIRATNE, 1990; BILIADERIS; GALLOWAY, 1989; LESMES et al., 2009; TANG; COPELAND, 2007).

As imagens obtidas em MEV mostraram que o aumento da concentração de GMS (Figura 20, A, B, C) parece não ter influenciado a intensidade de complexação no amido de trigo. No caso do amido de milho normal essas estruturas facetadas também foram observadas, porém as mesmas pareciam estar mais associadas ou grudadas umas às outras principalmente com 1 e 2% de GMS (Figura 21, A, B, C).

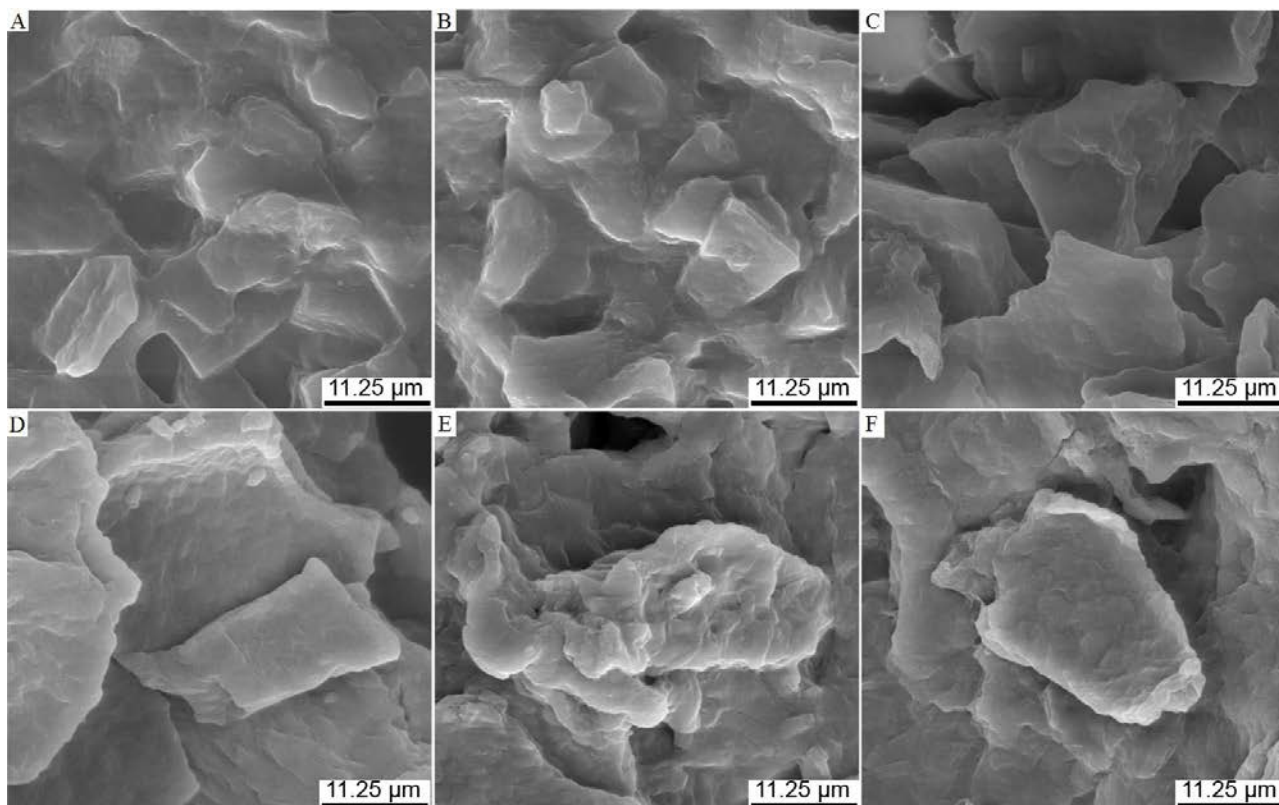


Figura 21: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de milho normal com GMS sem e com β CD observados em MEV.

A: 1% de GMS; B: 2% de GMS; C: 3% de GMS; D: 1% de GMS e 3% β CD; E: 2% de GMS e 3% β CD e F: 3%GMS e 3% β CD.

A adição de β CD provocou mudanças nas imagens observadas nos complexos de trigo e milho normal (Figuras 20 e 21, D, E, F), as quais ainda mostraram as estruturas facetadas, porém, com a superfície mais rugosa, independente da concentração de GMS presente, possivelmente pela presença da β CD que interferiu no complexo amilose-GMS.

As imagens obtidas em MEV das misturas de amido de milho ceroso e GMS (1, 2 e 3%) após complexação (Figura 22, A, B, C) mostraram uma massa disforme em vez das estruturas facetadas típicas de cristais. Esses resultados sugeriram a não formação de complexos entre este amido e o emulsificante, possivelmente pela pequena quantidade de amilose e de longas cadeias ramificadas de amilopectina capazes de se complexar com o GMS, em relação à quantidade de amilose nos outros amidos.

A presença da β CD praticamente não alterou as imagens obtidas (Figura 22, D, E, F), as quais mostraram as mesmas estruturas com aspecto de massa disforme.

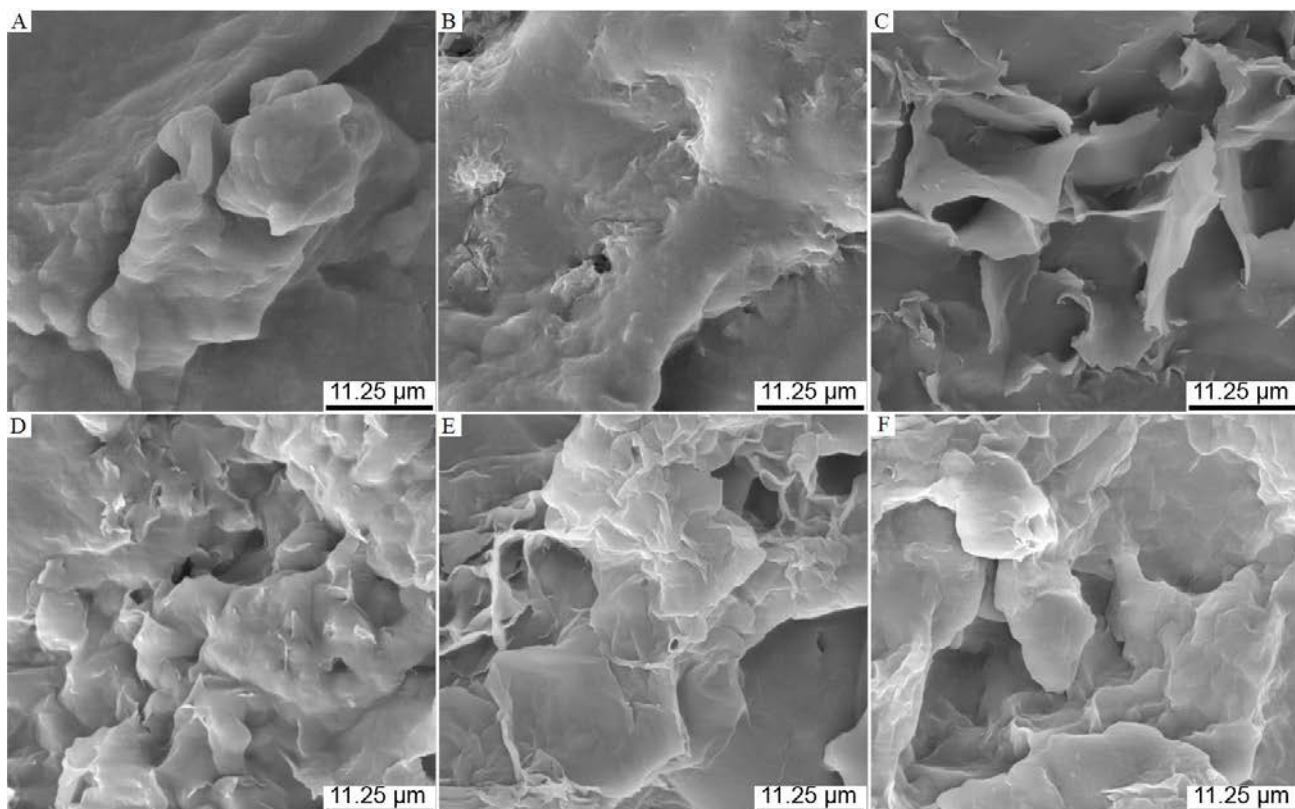


Figura 22: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de milho ceroso com GMS sem e com β CD observados em MEV. A: 1% de GMS; B: 2% de GMS; C: 3% de GMS; D: 1% de GMS e 3% β CD; E: 2% de GMS e 3% β CD e F: 3%GMS e 3% β CD.

As imagens dos complexos entre o amido de milho com alto teor de amilose e o GMS (Figura 23, A, B, C), ao contrário, mostraram as estruturas facetadas que aumentaram na medida em que a quantidade de GMS aumentou, possivelmente devido ao maior teor de amilose neste amido, indicando que concentrações menores que 3% GMS não foram suficientes para interagir com toda a amilose disponível para complexar. Na presença de β CD (Figura 23, D, E, F), as estruturas facetadas ainda permaneceram, porém com superfície um pouco mais rugosa como ocorreu com os amidos de trigo e milho normal, provavelmente devido á ação desestabilizante da β CD sobre os complexos cristalinos.

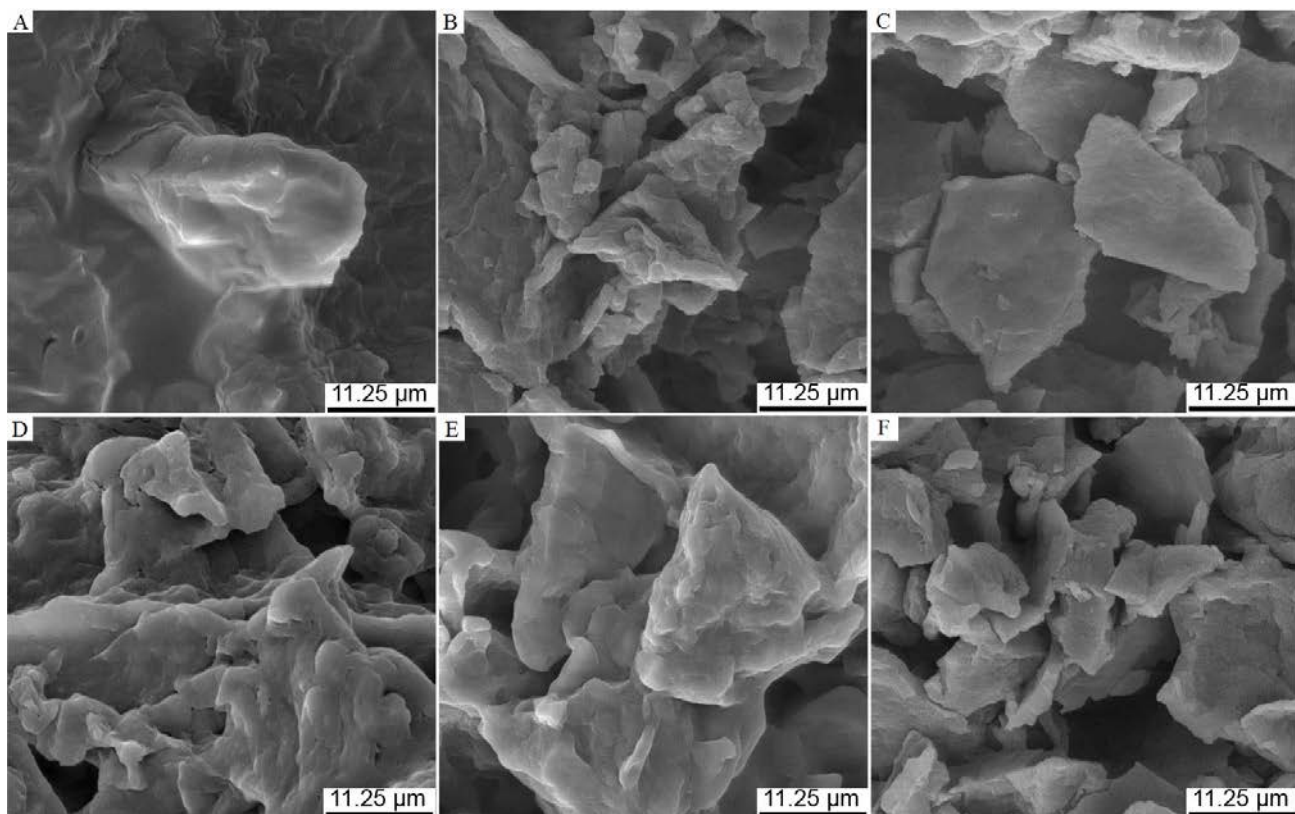


Figura 23: Micrografias dos complexos sintetizados do amido de milho com alto teor de amilose com GMS sem e com β CD observados em MEV.
A: 1% de GMS; B: 2% de GMS; C: 3% de GMS; D: 1% de GMS e 3% β CD; E: 2% de GMS e 3% β CD e F: 3%GMS e 3% β CD.

5.4.2 Microscopia de força atômica

A MFA foi usada para observar micros e nanoestruturas das superfícies dos complexos de inclusão amido-GMS na ausência e na presença da β CD.

As imagens topográficas em 3D dos complexos sintetizados de amidos de trigo com 1 e 3% de GMS (Figura 24, 1A, 1B) e de milho normal com 1 e 3% de GMS (Figura 24, 2A, 2B) mostraram a tendência dos cristais de se agregarem e formarem aglomerados com diâmetros de vários micrômetros. O aumento da concentração de GMS no amido de trigo resultou em acúmulo de partículas próximas aos aglomerados de cristais, que poderiam ser moléculas de GMS que se autoassociaram (Figura 24, 1B) na forma de agregados devido ao excesso de emulsificante após saturação da amilose disponível para complexação.

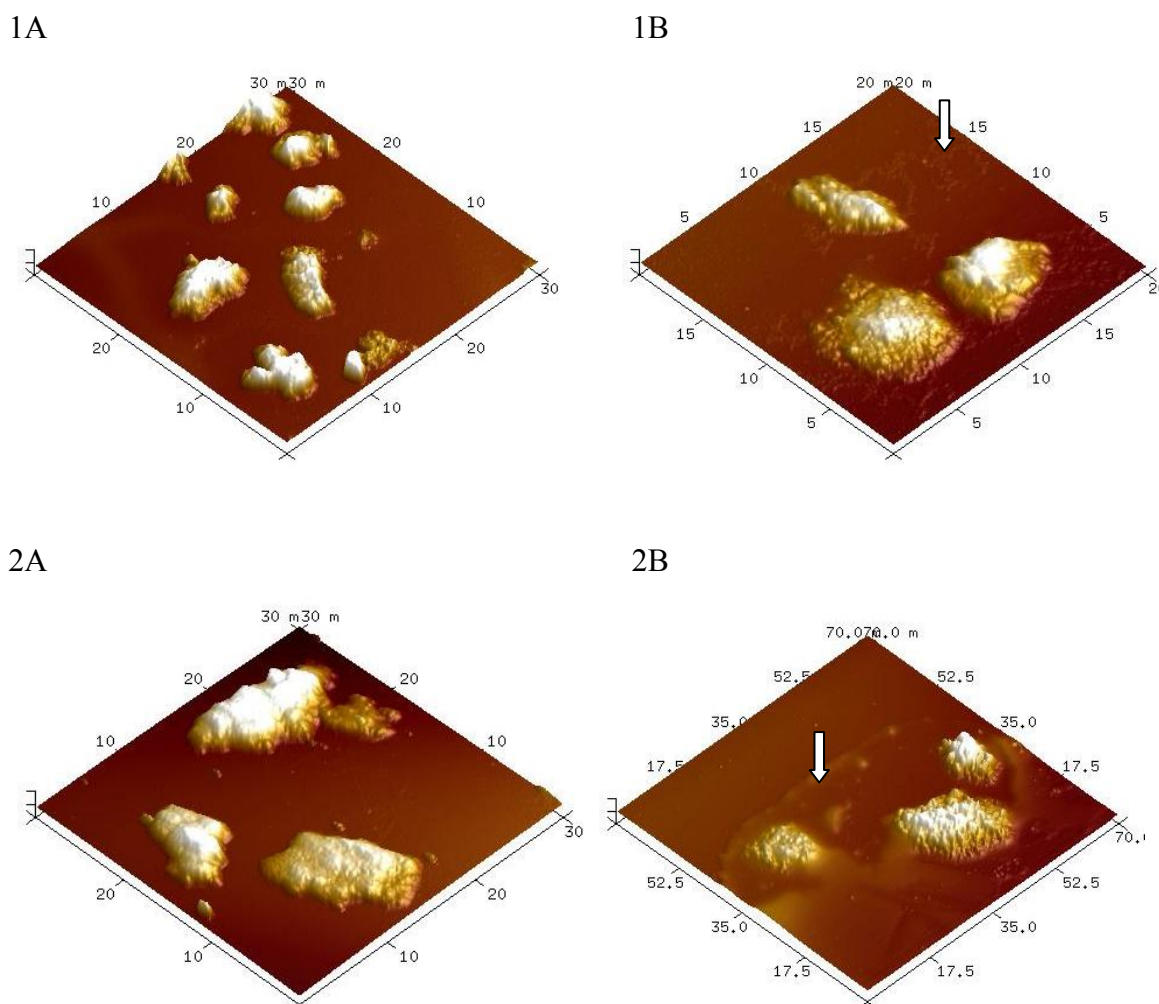


Figura 24: Imagens topográficas em 3D dos complexos sintetizados dos amidos de trigo e milho normal com GMS observados por MFA.

1A: amido de trigo com 1% de GMS (tamanho 30 μ m x 30 μ m); 1B: amido de trigo com 3% de GMS (tamanho 20 μ m x 20 μ m); 2A: amido de milho normal com 1% de GMS (tamanho 30 μ m x 30 μ m); 2B: amido de milho normal com 3% de GMS (tamanho 70 μ m x 70 μ m).

No caso dos complexos de amido de milho-GMS (Figura 24, 2A, 2B), parece ter havido também formação de agregados de GMS, no entanto, foi possível observar também, a 3% de GMS, uma massa disforme (↓), sugerindo também a presença de cadeias de amilose gelatinizadas que não conseguiram se complexar com o GMS.

As imagens dos complexos dos amidos de trigo e de milho com o GMS na presença da β CD (Figura 25, 1A, 2A) também mostraram os aglomerados de cristais dos complexos. Na imagem topográfica em 3D mostraram também um gel ao redor dos aglomerados de cristais, (↓), principalmente nos complexos de milho, sugerindo uma associação não cristalina entre os cristais e a β CD.

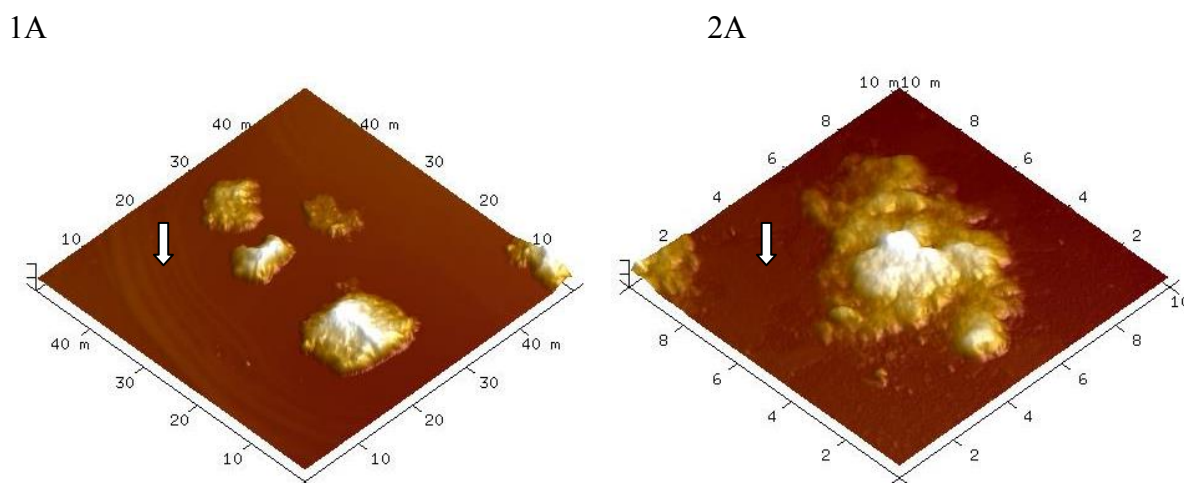


Figura 25: Imagens em 3D dos complexos sintetizados dos amidos de trigo e milho normal com GMS na presença de β CD observados por MFA.
1A: Amido de trigo com 1% de GMS e 3% β CD (tamanho 40 μ m x 40 μ m); 2A: amido de milho normal com 1% de GMS e 3% β CD (tamanho 10 μ m x 10 μ m).

Os complexos dos amidos de trigo e de milho normal com GMS e adicionados de β CD mostraram superfícies mais rugosas quando determinadas por MFA. Um exemplo do valor de rugosidade para o complexo de amido de milho normal com 1% de GMS na presença de β CD, obtido a partir do software NanoScope Analysis é apresentado na Figura 26. A rugosidade dos cristais de amido de trigo com 1% GMS aumentou de 40,5 nm para 76,1 nm quando teve β CD adicionada, enquanto esses valores aumentaram de 20,2 nm para 40,1 nm, para os complexos de amido de milho. Esses resultados sugeriram uma associação não cristalina entre a β CD e os cristais de complexos e confirmaram aqueles obtidos em MEV (Figuras 20, D, E, F e 21, D, E,

F) que mostraram cristais de complexos com a superfície mais rugosa, possivelmente pela presença da β CD que interferiu no complexo amilose-GMS.

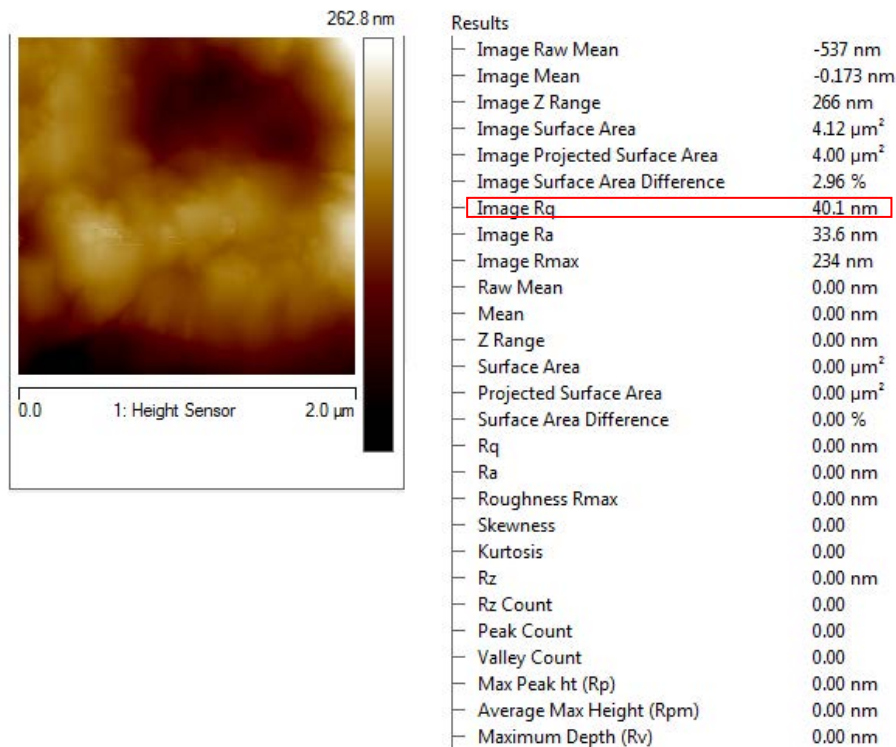


Figura 26: Imagem topográfica com tamanho de 2 μm x 2,0 μm e o perfil de rugosidade dos complexos sintetizados do amido de milho normal com 1% de GMS e 3% de β CD observados por MFA.

As imagens topográfica 3D e de contraste de fase obtidas em MFA dos complexos de amido de trigo e de milho normal com GMS obtidas de uma região da superfície de 2,0 μm x 2,0 μm são apresentadas na Figura 27.

Foi possível observar a partir das imagens topográficas em 3D dessa região, a formação de pequenas partículas com diâmetro de poucos nanômetros que corresponderam aos cristais organizados em lamelas empacotadas na forma de esferoides que tenderam a se agregar em aglomerados maiores como foi mostrado na Figura 24. Esses esferoides foram melhores observados nos complexos de amido de trigo do que nos de milho. Lesmes et al. (2009) e Zabar et al. (2010), a partir de estudos em MFA, relataram que os complexos amilose-V exibem agregados que compreendem pequenos esferulitos organizados em lamela com poucos microns de comprimento e espessura. Os resultados relatados por esses autores foram semelhantes aos encontrados neste trabalho por MEV e MFA.

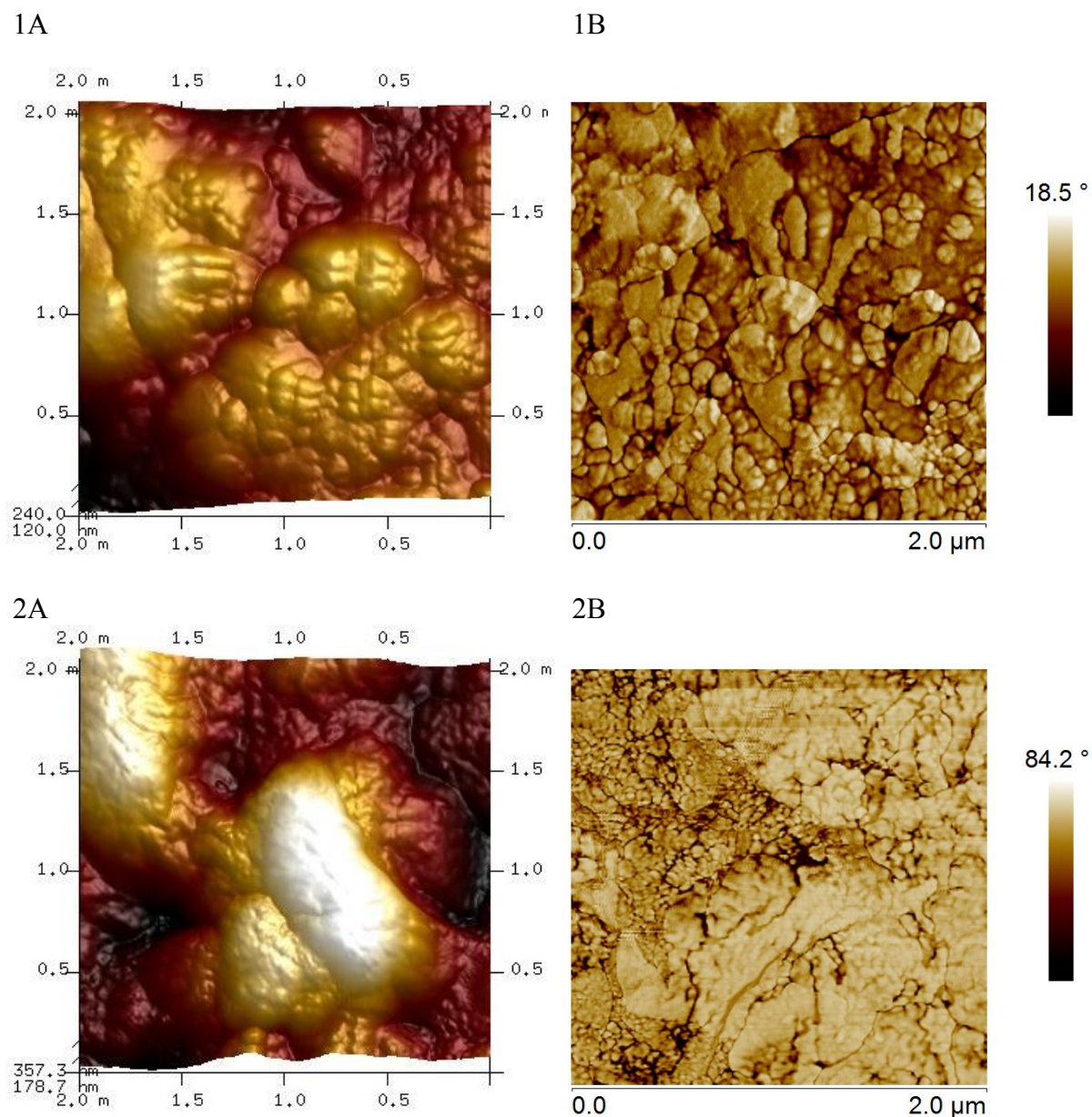


Figura 27: Imagens com tamanho de 2 μm x 2,0 μm dos complexos produzidos com 3% de GMS observados por MFA. A: imagem em 3D; B: imagem de fase. 1: amido de trigo; 2: amido de milho normal.

As imagens de fase mostraram que a complexação foi mais intensa no amido de trigo (Figura 27, 1B) do que no amido de milho (Figura 27, 2B), pois o contraste de fase foi mais intenso para o trigo, indicando uma maior heterogeneidade deste complexo. A presença de uma massa gelatinizada nos complexos de amido de milho normal também foi observada. Esses resultados sugeriram que a menor complexação do amido de milho com o emulsificante seja decorrente das menores cadeias de amilose do milho que não conseguiram acomodar as moléculas de GMS e gelatinizaram, confirmando aqueles resultados observados em MEV (Figuras 20 A, B, C e 21 A, B, C).

Ao contrário das micrografias obtidas em MEV (Figura 22, A, B, C), as imagens topográficas em 3D (Figura 28 1A e 1B) obtidas em MFA das misturas de amido de milho ceroso com 1 e 3% de GMS sugeriram a formação de complexos entre as poucas moléculas de amilose e/ou as longas cadeias ramificadas da amilopectina e o GMS, que pareciam estar embebidos em uma massa disforme gelatinizada.

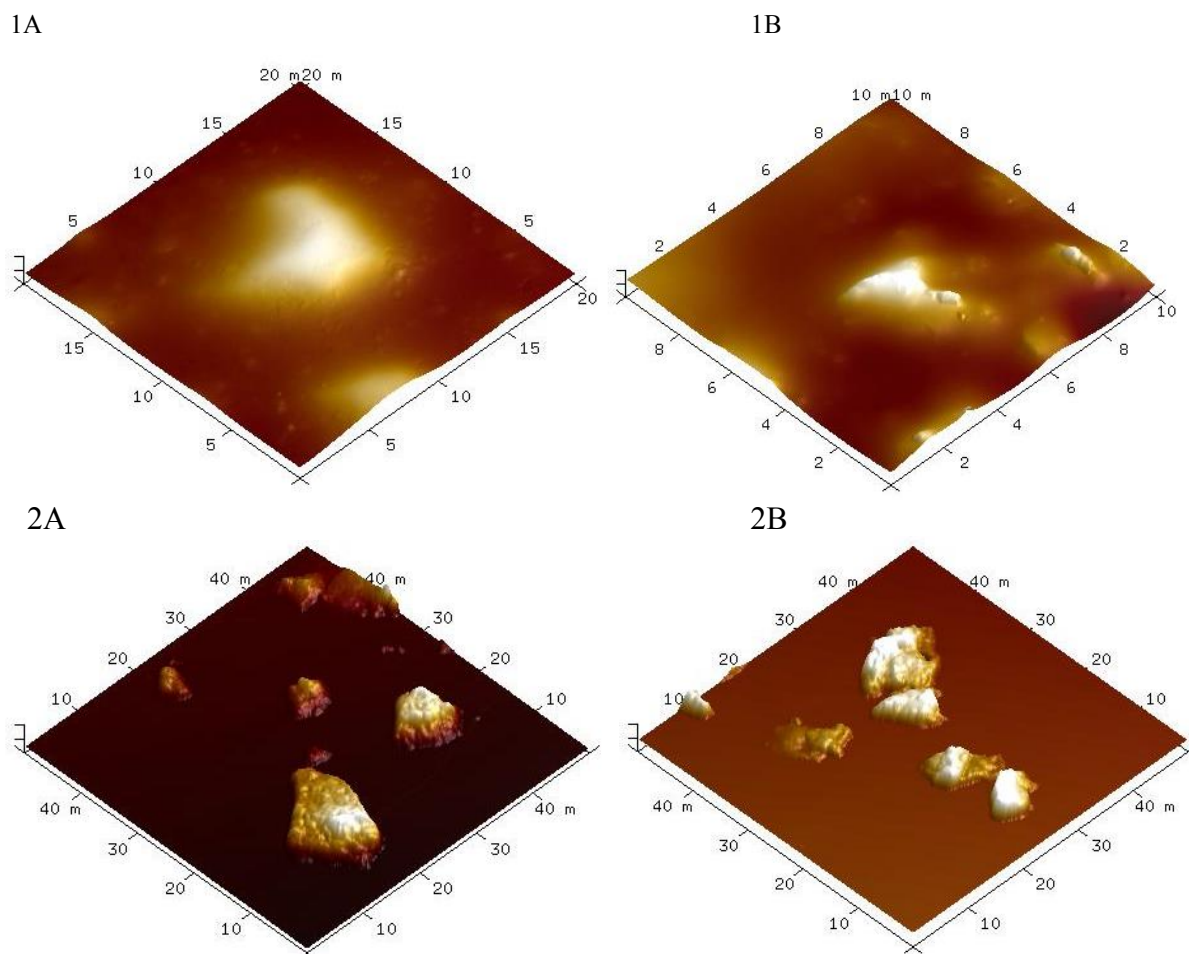


Figura 28: Imagens em 3D dos complexos sintetizados dos amidos com GMS observados por MFA. 1A: amido de milho ceroso com 1% de GMS (tamanho de 20 μm x 20 μm); 1B: amido de milho ceroso com 3% de GMS (tamanho de 20 μm x 20 μm); 2A: amido de milho com alto teor de amilose com 1% de GMS (tamanho de 40 μm x 40 μm); 2B: amido de milho com alto teor de amilose com 3% de GMS (tamanho de 40 μm x 40 μm).

As imagens em 3D obtidas por MFA dos complexos de amido de milho com alto teor de amilose com GMS (Figura 28, 2A, 2B) mostraram os agregados de cristais já observados para os outros amidos, porém não foi observado, mesmo a 3% de GMS, excesso de emulsificante nas superfícies próximas aos aglomerados de cristais, como observado para os complexos dos amidos de trigo e milho normal. Esses resultados sugeriram que concentrações

menores de 3% de GMS não foram suficientes para complexar com toda amilose disponível neste amido. Esses resultados confirmam aqueles obtidos pelo MEV (Figura 23, A, B, C).

A adição da β CD durante a síntese dos complexos de amido de milho ceroso (Figura 29, 1A) e de milho com alto teor de amilose com 1% de GMS (Figura 29, 2A) também não alterou a formação dos aglomerados de cristais, apesar dos mesmos apresentarem maior rugosidade que aqueles sintetizados sem a β CD. A rugosidade nos complexos do amido de milho com alto teor de amilose e 1% GMS aumentou de 50,9 nm para 67,1 nm quando β CD foi usada, confirmando os resultados obtidos em MEV (Figuras 22 D, E, F e 23 D, E, F). No entanto, nos complexos do amido de milho ceroso não foi possível obter os valores de rugosidade porque os cristais estavam embebidos em uma massa disforme gelatinizada.

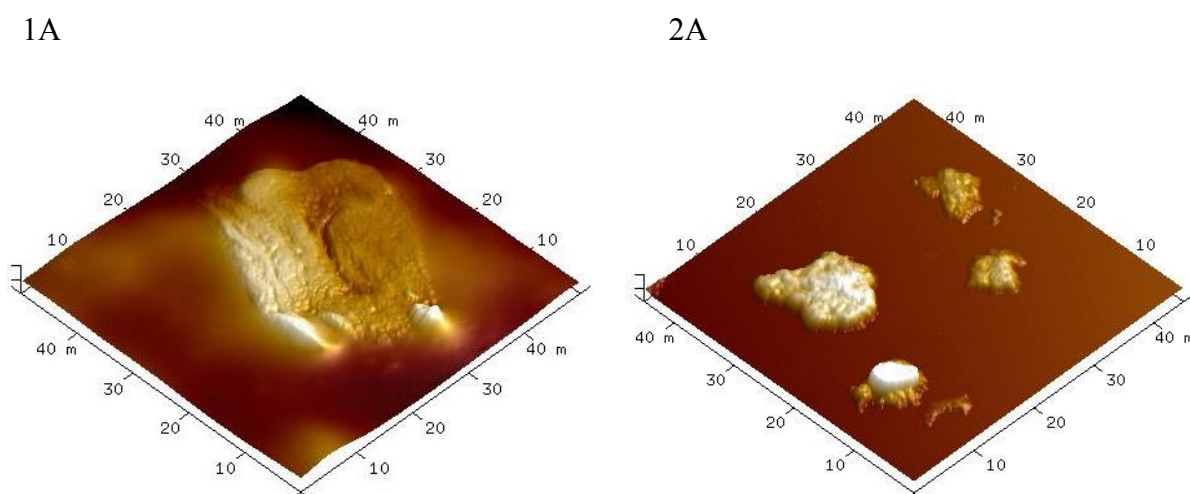


Figura 29: Imagens topográfica em 3D dos complexos sintetizados dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose com GMS na presença de β CD observados por MFA.
A: 1% de GMS e 3% β CD; 1: amido de milho ceroso; 2: amido de milho com alto teor de amilose.

5.4.3 Difração de raios-X

Os complexos sintetizados dos amidos de trigo (Figura 30) e milho normal (Figura 31) com 1, 2 e 3% de GMS apresentaram picos a 7° , 13° e 20° , em 2θ correspondente ao padrão cristalino tipo V_h polimorfismo II (BILIADERIS; GALLO A, 1989; KARKALAS et al., 1995; LESMES et al., 2009). Além disso, picos a 24° em 2θ foram observados para todos os complexos, os quais correspondiam aos agregados de GMS. Tang e Copeland (2007), Abar et al. (2010) e Chang, He e Huang (2013a,b) também relataram picos a 21° e 24° em 2θ e assumiram que esses picos foram resultantes do excesso das moléculas de lipídio que ficaram presas fisicamente entre as hélices e se autoassociaram. Acima de certa concentração, lipídios com maior comprimento da cadeia carbônica possuem baixa solubilidade em água e tendem a se associar em vez de formar complexos com a hélice de amilose. Em um sistema amido-lipídio-água, as moléculas de emulsificante podem interagir com o solvente água, e além de formar complexos com a amilose do amido, podem se autoassociar em estruturas micelares (TANG; COPELAND, 2007). Segundo Tang e Copeland (2007) quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do lipídio e menor sua solubilidade em água, maior a autoassociação do emulsificante. Esses autores também concluíram que a concentração micelar crítica diminui à medida que aumenta o comprimento da cadeia carbônica do lipídio e reduz a sua solubilidade em água.

Nos complexos de trigo e milho normal (Figuras 30 e 31, a, b, c), os picos dos difractogramas foram substancialmente reduzidos com o aumento na concentração de GMS. A cristalinidade relativa reduziu em 25% e 14% para os complexos de trigo e milho normal, respectivamente, quando a concentração aumentou de 1 para 3% GMS. Esses resultados sugerem que em maiores concentrações ocorre uma maior tendência do emulsificante em se autoassociar diminuindo então sua capacidade de complexação com a amilose devido a maior afinidade do GMS pelo próprio GMS. É possível que a concentração micelar crítica para os complexos de trigo e milho seja próxima de 1% GMS. Porém, mesmo a maiores concentrações as estruturas facetadas dos cristais foram observadas em MEV e MFA.

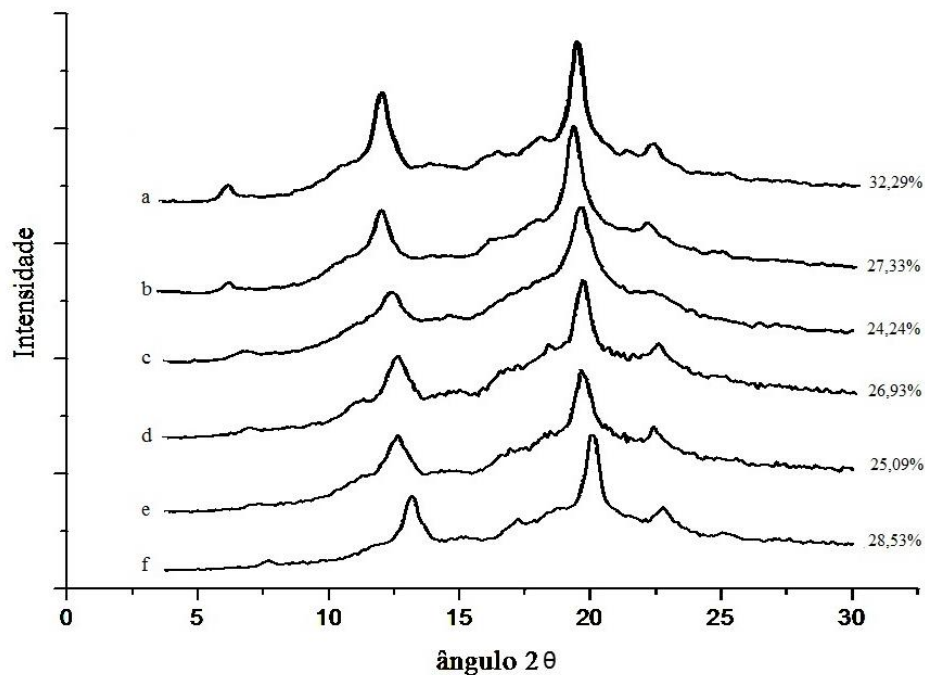


Figura 30: Difractogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de trigo:(a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD.

A adição da β CD na síntese dos complexos provocou redução na intensidade dos picos e na cristalinidade relativa dos complexos de trigo e milho normal (Figuras 30, 31, d, e, f, respectivamente), sugerindo uma desestabilização do complexo amilose-GMS devido a provável associação entre a β CD com o GMS, porém sem alteração do padrão cristalino. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por MEV e MFA que mostraram interferência da β CD nos complexos amilose-GMS aumentando a rugosidade dos cristais. No entanto, Tian et al. (2010) ao estudarem a interação entre a β CD e o complexo amido-lipídio natural presente no amido de arroz retrogradado, sugeriu a formação de um complexo entre amilose- β CD-lipídio em função do aparecimento de um novo pico a $16,2^\circ$ em 2θ e aumento da cristalinidade relativa do complexo.

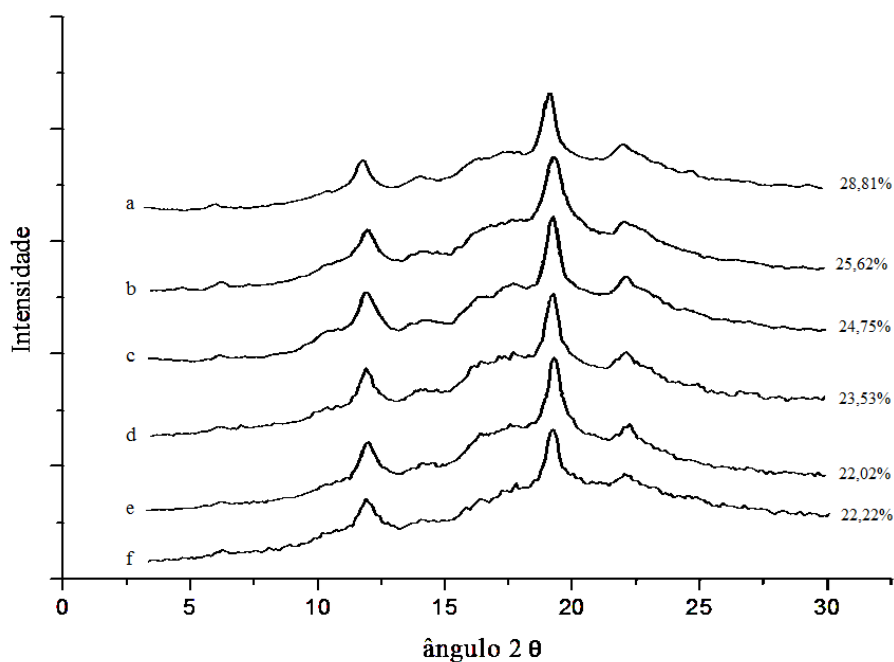


Figura 31: Difratogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de milho normal: (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3%βCD, (e) 2%GMS e 3%βCD e (f) 3%GMS e 3%βCD.

Apesar dos picos dos difratogramas de raios-X não apresentarem boa resolução, (Figura 32, a) estes confirmaram que houve formação de complexos entre as poucas moléculas de amilose e/ou as longas cadeias ramificadas da amilopectina do amido de milho ceroso e 1% GMS. No estudo *in vitro* não foi possível observar a formação desses complexos. Os difratogramas não apresentaram boa resolução devido à baixa concentração de complexos neste amido. Porém com 1% GMS foi possível observar os picos adequadamente a 7°, 13° e 20° em 2θ indicando a formação do complexo tipo V_h polimorfismo II. Maiores concentrações de GMS provocaram redução desses picos indicando a maior tendência à autoassociação das moléculas de GMS. Esses resultados confirmaram aqueles obtidos por MFA (Figura 28, 1A, 1B).

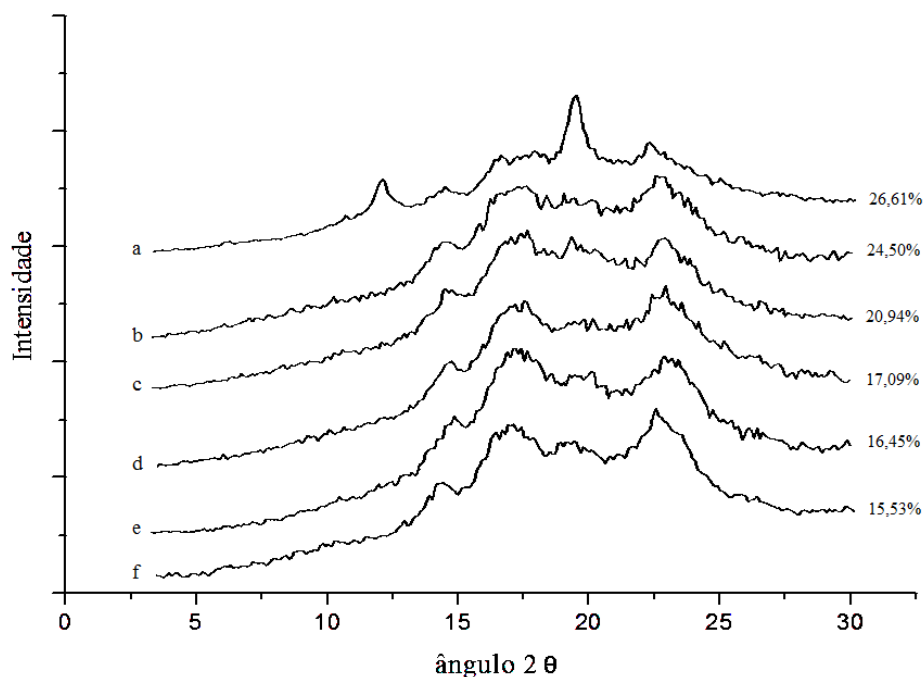


Figura 32: Difractogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de milho ceroso: (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD.

Os difractogramas dos complexos do amido de milho com alto teor de amilose (Figura 33, a, b, c) mostraram picos com excelente resolução para todas as concentrações de GMS devido seu alto teor de amilose (~50%), sugerindo que com 3% GMS ainda havia amilose para se complexar, resultados que também concordaram com aqueles observados em MEV. No entanto, a cristalinidade relativa também diminuiu com o aumento da concentração de GMS confirmando aqui, também, a tendência à autoassociação do emulsificante.

Picos a 24° em 2θ também foram observados para os complexos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose. Esse pico correspondeu ao padrão cristalino de agregados de GMS. Zhang et al. (2012) também encontraram padrão de difração de raios-x “tipo V” para os complexos amilose-ácido láurico, e confirmaram que lipídios com menor solubilidade em água tende a se autoassociar ao invés de formar complexos com as hélices de glicose, e então apresentaram picos a $\sim 21,5$ e $23,9^\circ$ em 2θ .

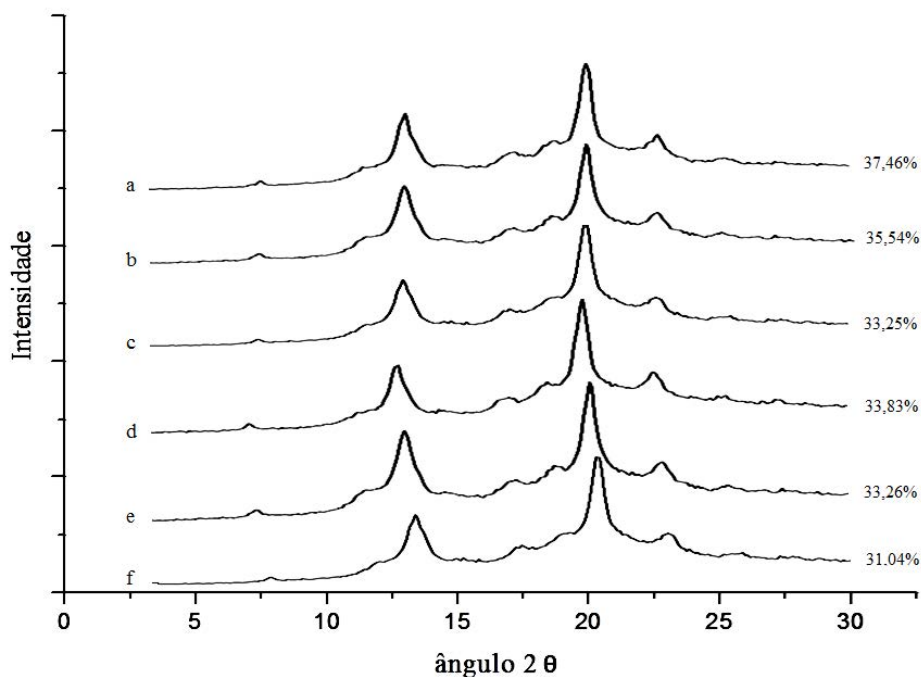


Figura 33: Difratogramas de raios-X dos complexos sintetizados de amido de milho com alto teor de amilose: (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3%βCD, (e) 2%GMS e 3%βCD e (f) 3%GMS e 3%βCD.

A presença da βCD nos complexos sintetizados dos amidos de milho ceroso (Figura 32, d, e, f) e milho com alto teor de amilose (Figura 33, d, e, f) com GMS também reduziu a cristalinidade nesses complexos, devido à desestabilização do complexo amido-GMS. Porém, a redução da cristalinidade nos complexos do amido de milho com alto teor de amilose e o GMS na presença da βCD foi menor que nos outros amidos, provavelmente porque, mesmo com o uso de 3% GMS ainda havia amilose disponível para se complexar, indicando que o efeito da desestabilização do complexo neste amido foi menos visível. O baixo efeito da interação βCD e GMS observada no estudo *in vitro* no amido de milho com alto teor de amilose se deu devido ao denso empacotamento das cadeias de amilose necessitando de alta temperatura para gelatinização deste amido. Porém, só após a síntese desses complexos é que foi possível sugerir que 3% GMS não saturou toda amilose disponível para se complexar.

Assim como nos complexos de amidos de trigo e milho normal com GMS e βCD, os complexos dos amidos de milho ceroso e milho com alto teor de amilose também não apresentaram formação de novos picos a partir dos difratogramas, indicando que não houve formação de um novo complexo cristalino entre amilose-βCD-GMS.

5.4.4 Propriedades térmicas

O perfil endotérmico dos complexos sintetizados dos amidos de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose com 1, 2 e 3% de GMS sem e com β CD, está mostrado na Figura 34.

No ciclo de aquecimento (A), os termogramas dos complexos de todos os amidos mostraram picos endotérmicos (115 a 120 °C) correspondentes a dissociação do complexo amilose-GMS, com exceção do amido de milho ceroso que em concentrações acima de 1% GMS não mostrou pico de dissociação do complexo, confirmando resultados de difractometria. As temperaturas de dissociação ($t_{cx} \sim 118$ °C) dos complexos confirmam os resultados obtidos anteriormente nos difractogramas de raios-X (Figuras 30, 31, 32 e 33) e nas imagens de MEV (Figuras 20, 21, 22 e 23) e MFA (Figuras 25 e 28) classificando-os como tipo V polimorfismo IIb, os quais são estruturas de cristais bem definidos com maiores temperaturas de dissociação (KARKALAS et al., 1995). Kawai et al. (2012) relataram que o complexo amido-lipídio que tem maior temperatura de pico reflete em maior comprimento helicoidal do complexo, isto significa que a estabilidade física do complexo é maior.

Também foi observado para os complexos dos amidos de trigo com 1, 2 e 3 % GMS sem β CD, dois picos endotérmicos ~ 105 °C e 118 °C (Figura 34, A, I, a, b, c) , sugerindo a formação de complexos tipos IIa e IIb, respectivamente. Biliaderis e Galloway (1989) e Karkalas et al. (1995) sugeriram que o polimorfismo tipo IIa indica hélices com uma estrutura supramolecular com menores registros cristalográficos, uma organização mais compacta e menores temperaturas de dissociação (~ 105 °C), enquanto o tipo IIb são estruturas de cristais bem definidos com maiores temperaturas de dissociação (~ 116 °C). As diferenças entre os polimorfismos IIa e IIb podem ser facilmente atribuídas às diferenças no tamanho e perfeição dos cristais formados.

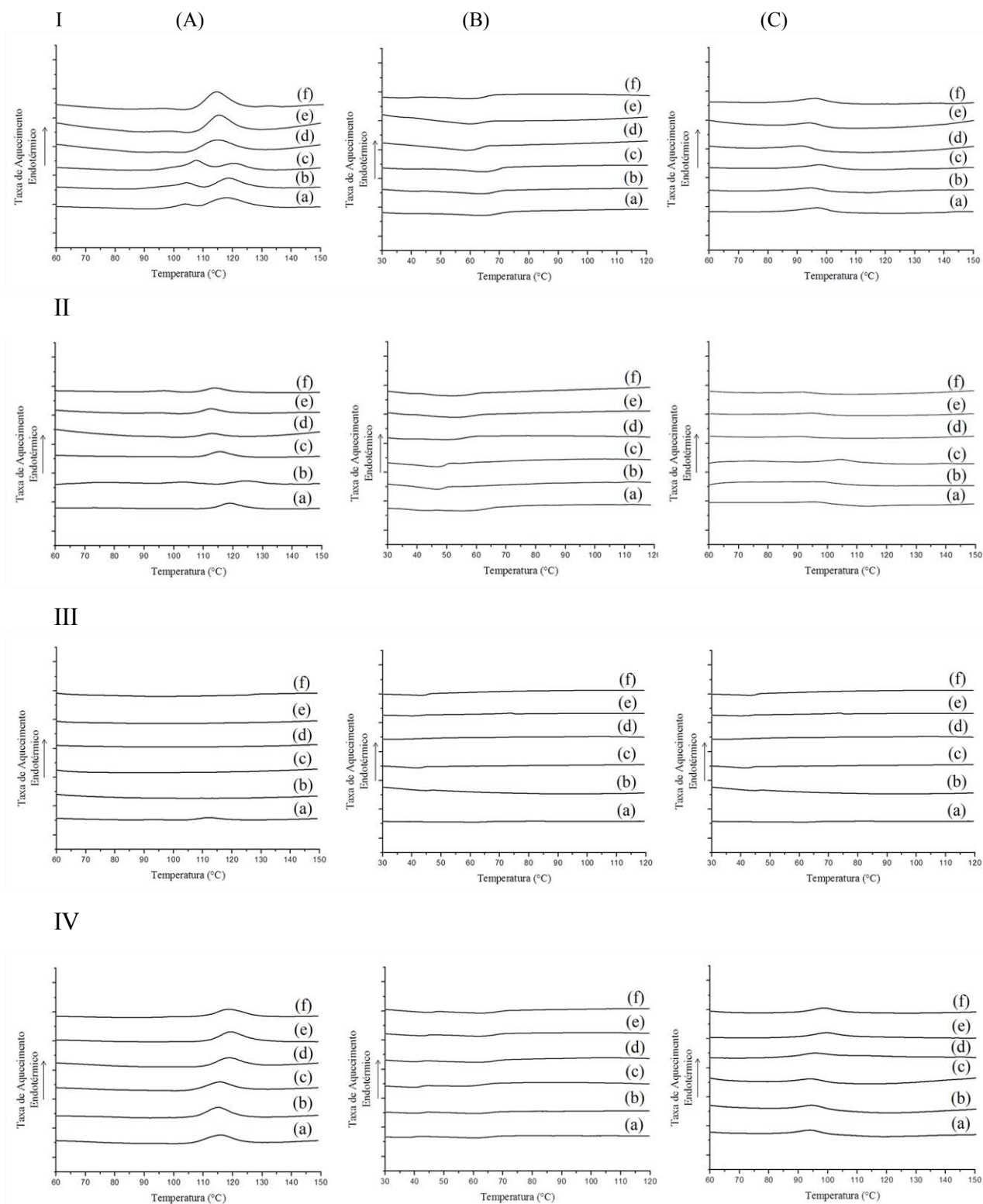


Figura 34: Curvas de DSC dos complexos sintetizados dos amidos de trigo (I), milho normal (II), milho ceroso (III), milho com alto teor de amilose (IV), com (a) 1% GMS; (b) 2% GMS; (c) 3% GMS, (d) 1%GMS e 3% β CD, (e) 2%GMS e 3% β CD e (f) 3%GMS e 3% β CD. A: 1o ciclo de aquecimento; B: resfriamento; C: 2o ciclo de aquecimento.

O aumento da concentração de GMS provocou aumento na temperatura de pico do complexo de amido de trigo (de 117,19 para 119,76 °C, Figura 34, A, I, a, b, c), enquanto provocou redução para o complexo de amido de milho normal (de 120,65 para 115,84 °C, Figura 34, A, II, a, b, c) e nenhuma alteração para o complexo de amido de milho com alto teor de amilose (Figura 34, A, IV, a, b, c). Esses resultados podem estar relacionados com a extensa cadeia carbônica do GMS e as diferenças entre as moléculas de amilose desses amidos. Chung e Liu (2009) e Ong et al. (1994) relataram diferentes GP para as amiloses de trigo e milho. O comprimento da cadeia de emulsificante também é um fator muito importante que determina as características e a extensão na formação do complexo. Emulsificantes com longas cadeias carbônicas, como no caso do GMS, conferem maior termoestabilidade ao complexo tipo V (GODET; BIZOT; BULÉON, 1995; MIRA; PERSSON; VILLWOCK, 2007; PUTSEYS et al., 2009). No entanto, quanto maior o emulsificante maior deve ser a molécula de amilose para acomodar as moléculas de emulsificante. Isso explica que o maior comprimento das cadeias de amilose do amido de trigo conferiu maior capacidade de complexação desse amido do que o amido milho normal.

Também foi observada redução da entalpia para os complexos de amidos de trigo e milho normal com o aumento da concentração de GMS (de 7,79 para 4,02 J/g para o complexo de amido de trigo e de 7,66 para 5,58 J/g para o complexo de amido de milho), confirmando que 1% de GMS foi suficiente para complexar com a amilose disponível, e acima dessa concentração houve maior tendência do GMS em se autoassociar diminuindo sua capacidade de complexação, como observado nos difractogramas de raios-X. Para os complexos de amido de milho com alto teor de amilose (Figura 34, A, IV, a, b, c) as diferentes concentrações de GMS não alteraram a entalpia, possivelmente 3% de GMS não foi suficiente para provocar a saturação da maior quantidade de amilose disponível para complexação neste amido. Karkalas et al. (1995) relataram que mudanças na entalpia podem ser atribuídas a energia requerida para desordenar e dissociar complexos helicoidais tipo V. Kawai et al. (2012) relataram também que a entalpia do complexo é uma medida tanto da quantidade de complexo quanto do grau de ordem cristalina dentro do complexo. Segundo Eliasson e Krong (1985) a contribuição para o grau de ordem cristalina é menor do que a quantidade de complexo.

A presença da β CD nos complexos de amido de trigo e milho normal (Figura 34, A, I, II, d, e, f) provocou redução nas t_{cx} , independente da concentração de GMS, indicando que as moléculas de β CD interferiram na continuidade (perfeição) dos cristais formados. Segundo Biliaderis et al. (1985) a cristalização de polímeros semicristalinos envolve 3 fases: a iniciação

da orientação dos segmentos das cadeias, o crescimento dos cristais e a perfeição e/ou continuidade desses cristais. No entanto, as temperaturas de dissociação indicam a perfeição dos cristais.

A entalpia de dissociação dos complexos (ΔH_{cx}) de amido de trigo na presença de β CD aumentou independente da concentração de GMS (de 4,02 para 10,63 J/g com 3% GMS) (Figura 34, A, I, d, e, f), enquanto que, para os complexos de amido de milho normal o ΔH_{cx} praticamente não se alterou, independente da concentração de GMS. Esses resultados indicaram que a β CD reduziu a autoassociação do GMS devido à interação entre a β CD e este lipídio no amido de milho normal, enquanto, no amido de trigo parece que a associação entre o GMS e a β CD foi mais intensa provocando aumento significativo do ΔH_{cx} , sugerindo que provavelmente houve um aumento da quantidade de cristais amilose-GMS desestabilizados pela β CD. Essa interação GMS- β CD provavelmente foi amorfa, pois não foram observados picos adicionais no padrão de raios-X. As imagens em 3D obtidas por MFA (Figura 26, 1A, 2A) mostraram que esses complexos apresentaram maior rugosidade e também mostraram um gel ao redor dos aglomerados de cristais, principalmente nos complexos de milho, sugerindo uma associação não cristalina entre os cristais e a β CD.

Nos termogramas dos complexos de amido de milho ceroso com GMS na presença de β CD (Figura 34 A, III, d, e, f) não foi possível observar qualquer pico endotérmico, como foi observado no termograma do complexo com 1% GMS sem β CD (Figura 34, A, III, a). A partir dos difractogramas de raios-X (Figura 32, d, e, f), a formação do complexo referente à estrutura V_h polimorfismo II foi observada somente na presença de 1% de GMS sem β CD (Figura 32, a), pois em concentração acima de 1% de GMS e após adição da β CD, não ocorreu a presença dos picos em 7° , 13° e 20° em 2θ , que são característicos do padrão cristalino amilose-V (Figura 32, b, c, d, e, f). A baixa quantidade de amilose, a presença de longas cadeias ramificadas da amilopectina, assim como o aumento da concentração de GMS, contribuíram para que ocorresse a autoassociação do excesso de GMS, que impediu a formação do complexo ou pelo menos este foi formado em quantidades não suficientes capazes de alterar os padrões de DSC e de raio-X. As imagens obtidas em MEV (Figura 22, A, B, C), também, não mostraram nitidamente que houve formação de cristais entre as longas cadeias de amilopectina e o GMS, independente da presença de β CD.

Nos complexos do amido de milho com alto teor de amilose a presença da β CD (Figura 34, A, IV, d, e, f) provocou aumento da t_{cx} (117,93 para 119,79 °C com 3% GMS), porém a entalpia só foi reduzida de 14,45 para 11,56 J/g no complexo com 3% GMS. No estudo *in vitro*

foi observado o aumento do ΔH_{cx} de 10,72 para 18,11 J/g (Figura 12, A, IV, b) na presença da β CD no amido de milho com alto teor de amilose adicionado de 3% GMS. No entanto, os complexos já sintetizados mostraram nos difractogramas de raios-X picos com excelente resolução e as imagens de MEV e MFA mostraram estruturas ainda facetadas, porém rugosas. Esses resultados indicaram que possivelmente mesmo com 3% GMS ainda havia amilose disponível para se complexar, sugerindo uma menor desestabilização dos complexos pela β CD.

Na curva de resfriamento (B) os complexos foram formados e recristalizados. O aumento da concentração de GMS provocou redução da intensidade de complexação no amido de trigo devido a uma redução de 60,3% do ΔH_{cx} (de -6,14 J/g com 1% GMS para -2,44 J/g com 3% GMS) (Figura 34, B, I, a, b, c), enquanto para o amido de milho não houve abrupta alteração com as diferentes concentrações de GMS utilizadas devido a uma redução de apenas 8,9% do ΔH_{cx} (de -1,92 J/g com 1% GMS para -1,75 J/g com 3% GMS) (Figura 34, B, II, a, b, c). O amido de milho com alto teor de amilose também apresentou redução de aproximadamente 10% da intensidade de complexação (Figura 34, B, IV, a, b, c). Nos complexos do amido de milho ceroso a intensidade de complexação foi tão baixa com o aumento da concentração de GMS que não foi possível observar as curvas de DSC nas concentrações acima de 1% GMS (Figura 34, B, III, b, c). No geral, os complexos dos amidos de trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose com diferentes concentrações de GMS na presença da β CD apresentaram aumento da entalpia. Os picos exotérmicos referentes à recristalização dos complexos com GMS sem e com β CD ocorreram a temperaturas mais baixas que aquelas dos picos de fusão. Biliaderis et al. (1985) relataram que as curvas de resfriamentos estão associadas com a organização das hélices dos complexos amido-lipídios em uma estrutura supramolecular semicristalina. Esses agregados moleculares formados no resfriamento podem exibir uma perfeição nos domínios cristalinos, considerando que é um processo que ocorre a uma velocidade muito menor. Eliasson (1994) confirma que os cristais formados no resfriamento são mais fortes do que os do primeiro aquecimento, e ocorrem a uma temperatura menor do que a do primeiro aquecimento.

Durante o segundo aquecimento (C), a dissociação do complexo recristalizado com GMS aconteceu com menor força com aumento da concentração de GMS, provocando uma leve redução do ΔH_{cx} , de 3,67 para 2,40 J/g e de 3,66 para 3,20 J/g, respectivamente para os amidos de trigo e milho normal adicionados de 1 e 3% de GMS (Figura 34, C, I, II, a, c, respectivamente), enquanto não houve alteração do ΔH_{cx} para os complexos do amido de milho com alto teor de amilose. Também não foi observado alteração da t_{cx} para os complexos dos

amidos de trigo e milho com alto teor de amilose, porém, os complexos do amido de milho mostraram aumento da t_{cx} de 96,10 para 101,78 °C quando a concentração de GMS aumentou de 1 para 3% de GMS (Figura 34, C, II, a, c). A presença de β CD, não provocou alteração da entalpia para os complexos estudados, devido à baixa interação da β CD. Na curva de reaquecimento, a dissociação do complexo de GMS sem e com β CD ocorreu a temperaturas inferiores àsquelas do primeiro aquecimento, pois a dissociação do complexo recristalizado acontece com menor força do que no primeiro aquecimento (ELIASSON, 1994).

5.4.5 Digestibilidade *in vitro*

De acordo com a classificação proposta por Englyst et al. (1992) foi definido que o conteúdo de amido degradado em 20 min é denominado de amido rapidamente digerível (ARD), enquanto aquele degradado em 120 min é denominado de amido lentamente digerível (ALD) e o amido resistente (AR) é a porção de amido que resistiu a ação das enzimas digestivas.

Os teores de ARD, ALD e AR dos amidos nativos e dos seus respectivos complexos sintetizados com 1% de GMS sem e com 3% de β CD estão apresentados na Tabela 16.

O amido nativo de milho normal apresentou maior conteúdo de ARD e menor teor de ALD e de AR quando comparado ao amido de trigo. Apesar do mesmo conteúdo de amilose desses amidos (~25%), as maiores quantidades de complexo amilose-lipídio naturalmente presente no amido de trigo, além das diferenças entre o tamanho molecular da amilose e sua organização no grânulo podem ter interferido na digestibilidade enzimática do amido. O conteúdo de ALD é provavelmente controlado pela própria estrutura granular do amido. Zhang, Ao e Hamaker (2006) relataram que a hidrólise de amidos de cereais nativos com pepsina por longos períodos reduziu o tamanho e alterou a morfologia do grânulo, porém não afetou o conteúdo de ALD, o qual foi afetado principalmente pela estrutura molecular do grânulo de amido. Englyst et al. (1992) e Zhang, Ao e Hamaker (2006) mostraram que amidos com estrutura cristalina tipo A apresentaram maior quantidade de ALD do que as ARD e AR, quando comparados aos amidos tipo B.

Tabela 16- Conteúdo de ARD, ALD e AR¹ dos amidos nativos e seus respectivos complexos sintetizados de amido de trigo, milho normal, milho ceroso e milho com alto teor de amilose com 1% de GMS sem e com 3% de βCD.

Concentração de GMS sem e com βCD (%)	ARD	ALD	AR
Trigo			
0	4,13 ± 0,19 ^c	56,34 ± 1,23 ^a	39,02 ± 0,57 ^a
1	17,90 ± 0,62 ^a	42,50 ± 1,01 ^b	38,70 ± 0,28 ^a
1+ βCD	12,70 ± 0,42 ^b	58,13 ± 0,82 ^a	28,23 ± 1,73 ^b
Milho normal			
0	18,01 ± 0,40 ^b	50,60 ± 0,72 ^b	30,90 ± 1,24 ^a
1	22,42 ± 1,11 ^a	47,80 ± 1,59 ^b	28,77 ± 0,40 ^a
1+ βCD	11,86 ± 0,71 ^c	65,90 ± 1,16 ^a	21,30 ± 1,17 ^b
Milho ceroso			
0	26,30 ± 0,01 ^c	63,10 ± 0,04 ^a	10,30 ± 0,01 ^a
1	39,91 ± 1,07 ^a	50,94 ± 1,20 ^b	9,14 ± 0,36 ^a
1+ βCD	34,40 ± 1,86 ^b	58,13 ± 1,76 ^{ab}	7,21 ± 0,67 ^b
Milho com alto teor de amilose			
0	13,09 ± 0,33 ^c	22,52 ± 1,61 ^b	63,04 ± 0,83 ^a
1	43,65 ± 0,41 ^a	15,23 ± 1,27 ^c	40,96 ± 0,86 ^b
1+ βCD	30,33 ± 2,04 ^b	45,51 ± 2,19 ^a	24,06 ± 1,01 ^c

¹Média de três determinações ± Desvio Padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente, para cada amido, pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05).

Entre os amidos estudados, o amido de milho ceroso, apresentou o mais baixo teor de AR, porém apresentou os maiores valores de ARD e ALD, devido seu baixo conteúdo de amilose (~1,10%).

Os amidos nativos de trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose apresentaram altos teores de AR por estarem na sua forma granular. Após a gelatinização do amido com consequente rompimento da estrutura granular, os teores de ALD e AR provavelmente reduziram. Chung, Liu e Hoover (2009) também observaram altos valores de ALD e AR para o amido de milho normal não gelatinizado (56,9 e 19,7%, respectivamente), que reduziram em mais da metade após gelatinização devido à perda da estrutura granular. Zhang et al. (2011) relataram que o amido de milho com alto teor de amilose nativo não cozido apresentou quase 70% de AR e após o cozimento esse valor reduziu para 6%. O teor de amilose é dos principais fatores que influenciam a resistência enzimática do amido. Os grânulos de amido que possuem maior conteúdo de amilose (milho com alto teor de amilose, ervilha

enrugada e grânulos menores, tipo B, do trigo) são mais resistentes ao ataque enzimático do que amidos com menor teor de amilose (milho normal, milho ceroso, e grânulos maiores, tipo A, de trigo) (GALLANT et al., 1992). A camada externa dos grânulos de amido de milho com alto teor de amilose é mais resistente à hidrólise ácida e enzimática, pois possui maior conteúdo de amilose e estas estão mais densamente empacotadas (JIANG et al., 2010). Sabe-se que o aumento do conteúdo de amilose na superfície do grânulo pode ser responsável pelo aumento à resistência enzimática (GALLANT, BOUCHE, BALDWIN, 1997; PAN, JANE, 2000).

Um novo tipo de amido resistente (AR 5) tem sido desenvolvido por meio do processamento de amidos complexados com ácidos graxos ou emulsificantes para possível uso como aditivo na indústria de alimentos.

O teor de AR dos complexos sintetizados seguiu a seguinte ordem decrescente: complexos com amidos de milho com alto teor de amilose, trigo, milho normal e milho ceroso. O maior AR dos complexos tem a ver principalmente com a maior quantidade e maior estabilidade dos cristais de complexos cristalinos. Esses resultados concordam com aqueles observados nas determinações estruturais dos complexos. Os complexos que apresentaram estruturas mais facetadas empacotadas na forma de esferulitos, maior cristalinidade e maiores ΔH_{cx} de dissociação, também mostraram maior resistência às enzimas. O complexo do amido de milho com alto teor de amilose apresentou os maiores valores de ΔH_{cx} (14,92 J/g), de cristalinidade (37,46%) e os maiores esferulitos de cristais, seguido à ordem decrescente pelos complexos dos amidos de trigo (32,39% e 7,79 J/g, respectivamente), milho normal (28,81% e 7,66 J/g, respectivamente) e milho ceroso (24,61% e 4,55 J/g, respectivamente). Zhang et al. (2012) relataram que houve diminuição de ALD e ARD e aumento de AR no amido de milho com alto teor de amilose complexado com ácido láurico, quando comparado ao amido não complexado e com o aumento do tempo de desramificação da amilose antes da complexação. Estes resultados mostraram que os amidos complexados são mais resistentes à hidrólise enzimática.

Como esses complexos, que apresentam altos valores de AR (trigo, milho normal e milho com alto teor de amilose), já sofreram a ação de altas temperaturas durante sua síntese, eles são estáveis a altas temperaturas, o que possibilitaria o seu uso como fonte de AR5 em produtos a serem processados.

A presença da β CD durante a síntese dos complexos de todos os amidos provocou aumento no teor de ALD e redução do ARD e do AR, indicando que ocorreu uma associação entre o GMS e β CD devido à redução da cristalinidade relativa desses complexos, observadas

no difractograma de raios-X. Esses resultados, também confirmaram os resultados obtidos no MEV e DSC, sugerindo uma desestabilização do complexo amilose-GMS devido à associação entre a β CD com o GMS. Han, Tian e Tong (2013) relataram aumento do ALD em amidos de arroz modificados pela β CD, sugerindo a formação de complexos de não inclusão com os lipídios, que mostraram uma fraca resistência as enzimas.

6 CONCLUSÕES

Diferenças nas características estruturais dos amidos das diferentes fontes botânicas com diferentes teores de amilose influenciam o efeito do GMS e da β CD nas propriedades físico-químicas dos amidos de cereais.

Existe competição entre a β CD e a amilose pela complexação com o GMS. Os amidos com teores similares de amilose, como os amidos de milho normal e de trigo, se comportaram de modo diferente quando na presença de GMS e da β CD. No amido de trigo, a interação do complexo amilose-lipídio é mais forte, no entanto mais sujeito a interferência da β CD que no amido de milho.

Todos os complexos sintetizados mostraram padrão cristalino tipo V_h polimorfismo II, incluindo aqueles formados a partir do amido de milho ceroso em que a complexação se deu também com as longas cadeias ramificadas da amilopectina.

A quantidade de emulsificante tem influência direta na formação desses complexos. Para os amidos de trigo, milho normal e milho ceroso, 1% de GMS foi suficiente para complexar com as moléculas de amilose e cadeias longas ramificadas da amilopectina, enquanto que para o amido de milho com alto teor de amilose, concentrações abaixo de 3% de GMS não foram suficientes para saturar toda amilose disponível para complexação.

Os complexos de todos os amidos com 1% de GMS mostraram-se resistentes á ação enzimática. O teor de AR foi maior nos complexos formados entre os amidos de milho com alto teor de amilose (40,96%), trigo (38,70%) e milho normal (28,77%) o que os torna fonte potencial de AR5.

A β CD desestabilizou a formação do complexo amilose-GMS e/ou amilopectina-GMS, em todos os amidos estudados, pela interação não cristalina entre ela e o GMS.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC – Approved methods of the American association of cereal chemists. 7 ed.; 2 v.; St, Paul, Minnesota, 2000.

AO, Z.; JANE, A. Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale and barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 46-55, 2007.

AZIZI, M. H.; RAO, G. V. Effect of surfactant in pasting characteristics of various starches. **Food Hydrocolloids**, p.1-5, 2005.

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

BIAIS, B.; LE BAIL, P.; ROBERT, P.; PONTOIRE, B.; BULÉON, A. Structural and stoichiometric studies of complexes between aroma compounds and amylose. Polymorphic transitions and quantification in amorphous and crystalline areas. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 306-315, 2006.

BILIADERIS, C. G.; GALLOWAY, G. Crystallization behavior of amylose-v complexes: structure-property relationships. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 31-48, 1989.

BILIADERIS, C. G.; PAGE, C. M.; SLADE, L.; SIRETT, R. R. Thermal behavior of amylose-complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, p. 365-389, 1985.

BILIADERIS, C. G.; SENEVIRATNE, H. D. On the supermolecular structure and metastability of glycerol monostearate-amylose complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, p. 185-206, 1990.

BIWER, A; ANTRANIKAN, G; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 609-617, 2002.

BOLTZ, K. W.; THOMPSON, D. B. Initial heating temperature and native lipid affects ordering of amylose during cooling of high-amylose starches. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 204-212, 1999.

BONILHA, P. R. M; MENOCCI, V; GOULART, A. J; POLIZELI, M. L. T. M; MONTI, R. Cyclodextrin glycosyltransferase from *bacillus licheniformis*: optimization of production and its properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 317-323, 2006.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

BULPIN, E. J.; WELSH, E. R.; MORRIS, E. R. Physical characterization of amylose-fatty acid complexes in granules and in solution. **Starch/Starke**, v. 34, p. 335-339, 1982.

CARLSON, T. L. G.; LARSSON, K.; DINH-NGUYEN, N.; KROG, N. A study of the amylase monoglyceride complex by Raman spectroscopy. **Starch/Stärke**, v. 31, n. 7, p. 222-224, 1979.

CHANG, F.; HE, X.; HUANG, Q. The physicochemical properties of swelled maize starch granules complexed with lauric acid. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 365-372, 2013a.

CHANG, F.; HE, X.; HUANG, Q. Effect of lauric acid on the V-amylose complex distribution and properties of swelled normal corn starch granules. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 89-95, 2013b.

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.

- CHUNG, H. J.; LIU, Q. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 807-815, 2009.
- CHUNG, H. J.; LIU, Q.; HOOVER, R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 436-447, 2009.
- CONDE-PETIT, B.; ESCHER, F.; NUESSELI, J. Structural features of starch-flavor complexation in food mode systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 227-235, 2006.
- COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527-1534, 2009.
- CRAIG, A. S.; MANINGAT, C. C.; SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Starch pasta clarity. **Cereal Chemistry**, v. 66, n. 3, p.173-182, 1989.
- CROWE, T. C.; SELIGMAN, S. A.; COPELAND, L. Inhibition of enzymatic digestion of amylose by free fatty acids in vitro contributes to resistant starch formation. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2006-2008, 2000.
- CUI, R.; OATES, C. G. The effect of amylose-lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. **Food Chemistry**, v. 65, p. 417-425, 1999.
- DE CASTRO, A. D.; SILVA JR, N. P.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C.; FREITAS, L. A. P.; GREMIÃO, M. P. D. A new approach to the granulation of β -ciclodextrin inclusion complexes. **Chemical Engineering Journal**, v. 164, p. 316-321, 2010.
- DEBET, M. R.; GIDLEY, M. J. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 452-465, 2006.
- DUNCAN, S. E. **Food Chemistry: Principles and Applications**. In: CHRISTEN, G. L.; SMITH, J. *Lipids: Basic concepts*. West Sacramento, CA: Science Technology System, 2000, p. 79-96.
- ELIASSON, A. C. **Starch in food: structure, function and applications**. Ed: Woodhead Publishing Limited, 2004. 605p.
- ELIASSON, A. C. Lipid-Carbohydrate Interactions. In: HAMER, R.J; HOSENEY, R.C. **Interactions: The Keys to Cereal Quality**. St. Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1998. 374p.
- ELIASSON, A. C. Interactions between starch and lipids studied by DSC. **Thermochimica Acta**, v. 246, p. 343-356, 1994.
- ELIASSON, A. C. On the effects of surface active agents on the gelatinization of starch – A calorimetric investigation. **Carbohydrate Polymers**, v. 6, p. 463-476, 1986.
- ELIASSON, A. C. Starch gelatinization in the presence of emulsifiers: A morphological study. **Starch/Stark**, v. 37, p. 411-415, 1985.
- ELIASSON, A. C.; KRONG, N. Physical properties of amylose monoglyceride complexes. **Journal of Cereal Science**, v. 3, p. 239-248, 1985.
- ENGLYST, H. N., KINGMAN, S. M; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 33-50, 1992.
- EVANS, I. D. An investigation of starch surfactant interactions using viscosimetry and Differential Scanning Calorimetry. **Starch/Stark**, v. 38, p. 227-235, 1986.
- EXARHOPOULOS, S.; RAPHAELIDES, S. N. Morphological and structural studies of thermally treated starch-fatty acid systems. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 139-152, 2012.

- FRACETTO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAES, C. M.; ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, A. L.; PAULA, E.; PERINHE, T. A.. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaina: β - ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, p. 1203-1207, 2007.
- FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.
- FRENCH, D. **Journal of Japan Society Starch Science**, v. 19, 1972 *apud* ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel Filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.
- FUENTES-ZARAGOZA, E.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; SENDRA, E.; SAYAS, E.; NAVARRO, C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. Resistant starch as prebiotic: A review. **Starch/Starke**, v. 63, p. 406-415, 2011.
- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, n. 3-4, p. 177-191, 1997.
- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BULÉON, A.; PEREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 3-16, 1992.
- GALLOWAY, G. I.; BILIADERIS, C. G.; STANLEY, D. W. Properties and structure of amylose-glycerol monostearate complexes formed in solution or on extrusion of wheat-flour. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 950-957, 1989.
- GELDERS, G. G.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A. Amylose-lipid complexes as controlled lipid release agents during starch gelatinization and pasting. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1493-1499, 2006.
- GELDERS, G. G.; DUYCK, J. P.; GOESAERT, F.; DELCOUR, J. A. Enzyme and acid resistance of amylose-lipid complexes differing in amylose chain length, lipid and complexation temperature. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 950-957, 2005.
- GELDERS, G. G.; VANDERSTUKKEN, T. C.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A. Amylose-lipid complexation: a new fractionation method. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 447-458, 2004.
- GEORGE, S. J.; VASUDEVAN, D. T.; Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP- β -Cyclodextrin-Meclizine HCl Inclusion Complexes, **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 4, p. 220-227, 2012.
- GODET, M. C.; BIZOT, H.; BULÉON, A. Crystallization of amylose-fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 47-52, 1995.
- GODET, M. C.; BOUCHET, B.; COLONNA, P.; GALLANT, D. J.; BULÉON, A. Crystalline amylose fatty acid complexes: morphology and crystal thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 1196-1201, 1996.
- GODET, M. C.; BULÉON, A.; TRAN, V.; COLONNA, P. Structural features of fatty acid-amylose complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 21, p. 91-95, 1993.
- GOHEN, R.; ORLOVA, Y.; KOVALEV, M.; UNGAR, Y.; SHIMONI, E. Structural and functional properties of amylose complexes with genistein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4212-4218, 2008.
- GUDMUNDSSON, M.; ELIASSON, A. C. Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants emulsifiers. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, p. 295-315, 1990.
- GOMES, L. M. M.; PETITO, N.; COSTA, V. G.; FALCAO, D. Q.; ARAUJO, K. G. L. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin. **Cereal Chemistry**, doi.10.1016, 2013.

- GUNARATNE, A.; CORKE, H. Influence of unmodified and modified cycloheptaamylose (β -cyclodextrin) on transition parameters of amylase-lipid complex and functional properties of starch. **Food Chemistry**, v. 68, n. 2, p.226-234, 2007.
- GUNARATNE, A.; CORKE, H. Effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on physical properties and transition parameters of amylose–lipid complexes of native and acetylated starches, *Food Chemistry*, v. 108, p. 14-22, 2008.
- HANASHIRO, I.; ABE, J.; HIZUKURI, S. A periodic distribution of chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 283, p. 151-159, 1996.
- HASJIM, J.; LEE, S. O.; HENDRICH, S.; SETIAWAN, S.; AI, Y.; JANE, J. I. Characterization of a novel resistant-starch and its effects on postprandial plasmaglucoase and insulin responses. **Cereal Chemistry**, v. 87, p. 257-262, 2010.
- HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; ABE, J.; HANASHIRO, I.; MATSUNOBU, G.; KIYOTA, H. Analytical developments: Molecular and microstructural characterization. In: FRAZIER, P. J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. **Starch: Structure and Functionality**. London: Royal Society of Chemistry. 1997. p. 121-128.
- HOLM, J.; BJORCK, I.; OSTROWSKA, S.; ELIASSON, A. C.; ASP, N. G. Digestibility of amylose-lipid complexes in-vitro and in-vivo. **Starch/Starke**, v. 35, p. 294-297, 1983.
- HOOD, L. F.; SEIFRIED, A. S. Effect of storage on the microstructure and syneresis of modified tapioca starch-milk gels. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 121-124, 1974.
- IMMEL, S., LICHTENTHALER, F. W. The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex. **Starch-Stärke**, v. 52, p. 1-8, 2000.
- JACOBS, H.; MISCHENKO, N.; KOCH, M. H. J.; EERLINGEN, R. C.; DELCOUR, J. A.; REYNAERS, H. Evaluation of the impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato starches: a differential scanning calorimetry and small angle x-ray scattering study. **Carbohydrate Research**, v. 306, p. 1-10, 1998.
- JANE, J. Structure of starch granules. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 54, p. 31-36, 2007.
- JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, v. 53, p. 205-213, 2006.
- JANE, J.; CHEN, J. F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 60-65, 1992.
- JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 629-637, 1999.
- JANE, J.; CRAIG, S. A. S. SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Characterization of granular cold water-soluble starch. **Starch/Starke**, v. 38, p. 258-263, 1986.
- JANE, J.; KASEMSUWAN, T.; CHEN, J. F. Phosphorous in rice and other starches. **Cereal Foods World**, v. 41, n. 11, p. 827-832, 1996.
- JANE, J.; ROBYT, J. F. Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. **Carbohydrate Research**, v. 132, p. 105- 118, 1984.
- JIANG, H.; CAMPBELL, M.; BLANCO, M.; JANE, J. Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches: Part II. Structures and properties of starch residues remaining after enzymatic hydrolysis at boiling-water temperature. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p. 1-12, 2010.

- KASEMSUWAN, T.; JANE, J.; SCHNABLE, P.; ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Ae1-5180) maize starch. **Cereal chemistry**, v. 72, n. 5, p. 457-464, 1995.
- KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives of starch phospholipids by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 702-707, 1996.
- KARKALAS, J.; MA, S.; MORRISON, W. R.; PETHRICK, R. A. Some factors determining thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. **Carbohydrate Research**, v. 268, p. 233-247, 1995.
- KAUR, L.; SINGH, J.; SINGH, N. Effect of glycerol monostearate on the physic-chemical, thermal, rheological and noodle making properties of corn and potato starches. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 839-849, 2005.
- KAWAI, K.; TAKATO, S.; SASAKI, T., KAJIWARA, K. Complex formation, thermal properties, and in-vitro digestibility of gelatinized potato starch-fatty acid mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 228-234, 2012.
- KEETELS, C. J. A. M.; VANVLIET, T.; JURGENS, A.; WASTRA, P. Effects of lipid surfactants on the structure and mechanics of concentrated starch gels and starch bread. **Journal of Cereal Science**, v. 24, p. 33-45, 1996.
- KIM, H. O.; HILL, D. Physical characteristics of wheat starch granule gelatinization in the presence of cycloheptaamylose. **Cereal Chemistry**, v. 61, 432-435, 1984.
- KRONG, N. Theoretical aspects of surfactants in relation to their use in breadmaking. *Cereal Chemistry*, v. 58, p. 158-164, 1981.
- KRONG, N. Influence of food emulsifiers on pasting temperature and viscosity of various starches. *Starch/Starke*, v. 25, p. 22-27, 1973.
- KRONG, N.; JENSEN, B. N. Interactions of monoglycerides in different physical state with amylose and their anti-firming affects in bread. **Journal of Food Technology**, v. 5, p. 77-82, 1970.
- KURAKAKE, M.; AKIYAMA, Y.; HAGIWARA, H.; KOMAKI, T. Effects of cross-linking and low molecular amylose on pasting characteristics of waxy corn starch. **Food Chemistry**, v.116, p. 66-70, 2009.
- LAGENDIJK, J., PENNING, H. J. Relation between complex formation of starch with monoglycerides and the firmness of bread. **Journal of Cereal Science**, v. 15, p. 354- 365, 1970.
- LALUSH, I.; BAR, H.; ZAKARIA, I.; EICHLER, S.; SHIMONI, E. Utilization of amylose-lipid complexes as molecular nanocapsules for conjugated linoleic acid. **Biomacromolecules**, v. 6, 0. 121-130, 2005.
- LE BAIL, P.; BIZOT, H.; OLLIVON, M.; KELLER, G.; BOURGAUX, C.; BULÉON, A. Monitoring the crystallization of amylose-lipid complexes during maize starch melting by synchrotron X-ray diffraction. **Biopolymers**, v. 50, p. 99-110, 1999.
- LESME, U.; CHEN, S. H.; SHENER, Y.; SHIMONI, E. Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 667-675, 2009.
- LI, D.; HUANG, J. C.; CORKE, H. Effect of β -cyclodextrin on pasting properties of wheat starch. **Nahrung-Food**, v. 44, p. 164-167, 2000.
- LIM, S. T.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. L. Characterization of phosphorous in starch by P-31 nuclear magnetic-resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 468-472, 1994.
- LINDNER, K.; SAENGER, W. Crystal and molecular structure of cycloheptaamylose dodecahydrate. **Carbohydrate Research**, v. 99, n. 2, p. 103-115, 1982.
- LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 329, n. 1-2, p. 1–11, 2007.

MIRA, I.; ELIASSON, A. C.; PERSSON, K. Effect of surfactant structure on the pasting properties of wheat flour and starch suspensions. **Cereal Chemistry**, v.82, p. 44-52, 2005.

MIRA, I.; PERSSON, K.; VILLWOCK, V. K. On the effect of surface active agents and their structure on the temperature-induced changes of normal and waxy wheat starch in aqueous suspension. Part 1. Pasting and calorimetric studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 665-678, 2007.

MORRISON, W. R. Lipids in cereal starches: a review. **Journal of Cereal Science**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 1988.

MORRISON, W. R. Starch lipids and how they related to starch granule structure and functionality. **Cereal Foods World**, v. 40, p. 437-445, 1995.

MORRISON, W. R.; LAW, R. V.; SANAPE, C. E. Evidence for inclusion complexes of lipids with V-amylose in maize, rice and oate starches. **Journal of Cereal Science**, v. 18, p. 107-109, 1993.

NAKAZAWA, Y.; WANG, Y. L. Effect of annealing on starch-palmitic acid interaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 327-335, 2004.

NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Modelling of rheological behaviour in starch lipid systems. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 632-639, 1996.

NARA, S.; KOMIAYA, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Starcke**, v. 35, p. 407-410, 1983.

NELLES, E. M.; DEWAR, J.; BASON, M. L.; TAYLOR, R. N. Maize starch biphasic pasting curves. **Journal of Cereal Science**, v. 31, p. 287-294, 2000.

NISHIYAMA, Y.; MAZEAU, K.; MORIN, M.; CARDOSO, M. B.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Molecular and Crystal structure of 7-fold V-amylose complexed with 2-propanol. **Macromolecules**, v. 43, p. 8628-8636, 2010.

ONG, M. H., JUMEL, K., TOKARCZUK, P. F., BLANSHARD, J. M. V., HARDING, S. E. Simultaneous determinations of the molecular weight distributions of amuloses and the fine structures of amylopectins of native starches. **Carbohydrate Research**, v. 260, p. 99-117, 1994.

PALAV, T.; SEETHARAMAN, K. Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 3, p. 364-370, 2006.

PAN, D. D.; JANE, J. L. Internal structure of normal maize starch granules revealed by chemical surface gelatinization. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 126-132, 2000.

PUTSEYS, J. A.; LAMBERTS, L.; DELCOUR, J. A. Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 238-247, 2010.

PUTSEYS, J. A., DERDE, L. J.; LAMBERTS, L.; OSTMAN, E.; BJORCK, I. M.; DELCOUR, J. A. Functionality of short chain amylose -lipid complexes in starch -water systems and their impact on in vitro starch degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1939-1945, 2010.

PUTSEYS, J. A.; LIESBETH, J. D.; LAMBERTS, L.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A. Production of tailor made short chain amylose-lipid complexes using varying reaction conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 854-861, 2009.

RADHIKA, G. S.; MOORTHY, S. N. Effect of sodium dodecylsulfate on the physicochemical, thermal and pasting properties of cassava starch, **Starch/Stärke**, v. 60, p. 87-96, 2008.

RAEKER, M.; GAINES, C. S.; FINNEY, P. L.; DONELSON, T. Granule size distribution and chemical

- composition of starches from 12 soft wheat cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 721-728, 1998.
- RAPHAELIDES, S. N.; GEORGIADIS, N. Effect of fatty acids on the rheological behaviour of pea starch dispersions during heating. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1188-1200, 2007.
- RAPPENECKER, G.; ZUGENMAIER, P. Detailed refinement of the crystal structure of Vh-amylose. **Carbohydrate Research**, v. 89, p. 11-19, 1981.
- RATNASOORIYA, C. C.; RUPASINGHE, H. P. V.; Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 134, p. 625-632, 2012.
- RICHARDSON, G.; KIDMAN, S.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A.M. Differences in amylose aggregation and starch gel formation with emulsifiers. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 1, p. 7-13, 2004.
- RIDOUT, M. J.; GUNNING, A. P.; PARKER, M. L.; WILSON, R. H.; MORRIS, V. J. Using AFM to image the internal structure of starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 123-132, 2002.
- ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel Filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.
- ROCHA, T. S.; CUNHA, V. A. G.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Structural characterization of Peruvian Carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch and the effect of annealing of its semicrystalline structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4208-4216, 2011.
- RUTSCHMANN, M. A.; SOLMS, J. Formation of inclusion complexes of starch with different organic compounds. 2. Study of ligand binding in binary model systems with decanal, 1-naphthol, monooleate and monopalmitate, **Food Science and Technology**, v. 23, p. 70-79, 1990.
- SALMAN, H.; BLAZEK, J.; LOPEZ-RUBIO, A.; GILBERT, E. P.; HANLEY, T.; COPELAND, L. Structure-function relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 705-711, 2009.
- SALMAN, H.; COPELAND, L. Effect of repeated heating and cooling cycles on the pasting properties of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 105-109, 2010.
- SCHOCH, T. J. Methods in carbohydrate chemistry, vol. 5. In: Whistler, R. L. (Ed.). v. 5. Academic press, New York, 1964, p. 106.
- SCHOCH, T. J. Non-carbohydrate substances in the cereal starches. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, p. 2964-2973, 1942.
- SENEVIRATNE, H. D.; BILIADERIS, C. G. Action of alpha-amylases on amylose-lipid complex superstructures. **Journal of Cereal Science**, v. 13, p. 129-143, 1991.
- SHIM, S. Y.; AHM, S. H.; KWAK, J. Functional properties of cholesterol-removed whipping cream treated by β -cyclodextrin. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2767-2772, 2003.
- SICARD, P. J.; SANIEZ, M. H.; Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products. In: Duchene, D. (Ed.), **Cyclodextrins and Their Industrial Uses**. Editions de Sant'e, Paris, p. 77-103, 1987.
- SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.
- SIEVERT, D.; HOLM, J. Determination of amylose by differential scanning calorimetry. **Starch/Stärke**, v. 45, p.136-139, 1993.

- SMITH, A. R.; CARUSO, T. E. Determination of phosphorous content. In: WHISTLER, R. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**; Starch. New York: Academic Press. 1964. v. 4; p. 43-47.
- SNAPE, C.E.; MORRISON, M. M.; MAROTO-VALER, J.; KARKALAS, J.; PETHRICK, R. A. Solide state ¹³C NMR investigation of lipid ligands in V-amylose inclusion complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 225-237, 1998.
- SRICHUWONG, S.; SUNARTI, T. C.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 529-538, 2005.
- STAFFORD, R. E.; DENNIS, E. A. Lysophospholipids as biosurfactants. **Colloids and Surfaces**, v. 30, p. 47-64, 1988.
- STASOFT. **STATISTICA 7.0 for Windows** – Computer program manual. Tulsa: Statsoft, Inc., 2007. CD Room.
- STAUFFER, C. E. **Functional Additives for Bakery Foods**, 1nd ed.; Van Nostrand Reinhold: New York;, 1990.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 137-142, 2004.
- TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S. Structures of rices amylopectins with low and high affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v. 37, p. 79-88, 1987.
- TANG, M. C.; COPELAND, L. Analysis of complexes between lipids and wheat starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 80-85, 2007.
- TANG, H.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 217-224, 2002.
- TESTER, R. F. Starch: The polysaccharide fractions. In: FRAZIER, P. J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. **Starch: Structure and Functionality**. London: Royal Society of Chemistry. 1997. p. 163-171.
- TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of starches 1. Effects of amylopectins, amyoses and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551-557, 1990.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.
- TIAN, Y.; LI, Y.; MANTHEY, F. A.; XU, X.; JIN, Z.; DENG, L. Influence of β -cyclodextrin on the short-term retrogradation of rice starch. **Food Chemistry**, n. 116, n. 1, p. 54-58, 2009.
- TIAN, Y.; LI, Y.; JIN, Z.; XU, X. Comparison tests of hydroxylpropyl β -cyclodextrin (HP β CD) and β -cyclodextrin (β CD) on retrogradation of rice amylose. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 488-491, 2010.
- THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches: Practical Guides for the Food Industry**, 2nd ed.; Eagan Press: St Paul, 1999.
- THOMSON, N. H.; MILES, M. J.; RING, S. G.; SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Real-time imaging of enzymatic degradation of starch granules by atomic force microscopy. **Journal of Vacuum Science and Technology B**, v. 12, p. 1565-1568, 1994.
- TUFVESSON, F.; ELIASSON, A. C. Formation and crystallization of amylose-monoglyceride complex in a starch matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 359-365, 2000.

- TUFVESSON, F.; SKRABANJA, V.; BJORCK, I.; ELMSTAHL, H. L.; ELIASSON, A. C. Digestibility of starch systems containing amylose-glycerol monopalmitin complexes. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 34, p. 131-139, 2001.
- TUFVESSON, F.; WAHLGREN, M.; ELIASSON, A. C. Formation of amylose-lipid complexes and effects of temperature treatment. Part.2. Fatty acids. **Starch/Stärke**, v. 53, p. 138-149, 2003.
- VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; REYNAERS, H.; DELCOUR, J. A. Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granule starch. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1775-1786, 2004.
- VILLWOCK, V. K.; ELIASSON, A. C.; SILVERIO, J.; BEMILLER, J. N. Starch-lipid interactions in common, waxy, ae du, and ae su2 maize starches examined by Differential Scanning Calorimetry. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 292-298, 1999.
- WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 748-753, 2009.
- WHITTAM, M. A.; ORFORD, P. D.; RING, S. G.; CLARK, S. A.; PARKER, M. L.; CAIRNS, P.; MILES, M. J. Aqueous dissolution of crystalline and amorphous amylose alcohol complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 11, p. 339-344, 1989.
- WONG, K. S.; JANE, J. Effects of pushing agents on the separation and detection of debranched amylopectin by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 1, p.63-80, 1995.
- ZABAR, S.; LESMES, U.; KATZ, I.; SHIMONI, E.; BIANCO-PELED, H. Studying different dimensions of amylose-long chain fatty acid complexes: molecular, nano and micro level characteristics. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1918-1925, 2009.
- ZABAR, S.; LESMES, U.; KATZ, I.; SHIMONI, E.; BIANCO-PELED, H. Structural characterization of amylose-long chain fatty acid complexes produced via the acidification. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 347-357, 2010.
- ZHANG, G. Y.; AO, Z. H.; HAMAKER, B. R. Slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3252-3258, 2006.
- ZHANG, B.; HUANG, Q.; LUO, F. X.; FU, X. Structural characterizations and digestibility of debranched high-amylose maize starch complexed with lauric acid. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 174-181, 2012.
- ZHANG, L. L.; HU, X. T.; XU, X. M.; JIN, Z. Y.; TIAN, Y. Q. Slowly digestible starch prepared from rice starches from rice starches by temperature-cycled retrogradation. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 970-974, 2011.
- HAN, J.; TIAN . ; TONG, Q. Preparation and slowly digestible properties of β -cyclodextrins (β -CDs)-modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 609-612, 2013.
- ZHOU, H. Y, JIANG, L. J.; ZHANG, Y.-P.; LI, J.-B. β -Cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization, and its aspirin release *in vitro*. **Frontiers of Materials Science**, v. 6, p. 259-267, 2012.
- ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch/Stärke**, v. 40, n. 2, p. 44-50, 1988.
- YONEMOTO, P. G.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; FRANCO, C. M. L. Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 761-771, 2007.
- YOO, S. H.; JANE, J. L. Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 297-305, 2002.

XIE, X.; LIU, Q.; CUI, S. W. Studies on the granular structure of resistant starches (type 4) from normal, high amylose and waxy corn starch citrates. **Food Research International**, v. 39, p. 332-341, 2006.