



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

Mariana Souza Costa

Produção e caracterização estrutural, molecular e morfológica de  
nanocristais a partir de diferentes amidos e sua aplicação em biofilmes

São José do Rio Preto  
2017

Mariana Souza Costa

Produção e caracterização estrutural, molecular e morfológica de nanocristais a partir de diferentes amidos e sua aplicação em biofilmes

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP -Proc. 2013/01500-7

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Landi Franco  
Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Victória Eiras Grossmann

São José do Rio Preto  
2017

Costa, Mariana Souza.

Produção e caracterização estrutural, molecular e morfológica de nanocristais a partir de diferentes amidos e sua aplicação em biofilmes / Mariana Souza Costa. -- São José do Rio Preto, 2017

166f. : il., tabs.

Orientador: Célia Maria Landi Franco

Coorientador: Maria Victória Eiras Grossmann

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Nanopartículas. 3. Nanocristais. 4. Amido. 5. Biofilme. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 664

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

Mariana Souza Costa

Produção e caracterização estrutural, molecular e morfológica de nanocristais a partir de diferentes amidos e sua aplicação em biofilmes

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2013/01500-7

### Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Landi Franco  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thaís de Souza Rocha  
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magali Leonel  
UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
07 de Junho de 2017

### **Dedico este trabalho**

À Deus, aos meus pais, José e Vera, aos meus irmãos, Luciana e Guilherme e ao meu namorado Thiago pela cumplicidade, companheirismo e por acreditarem na minha capacidade de superação.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente à Deus por sempre estar ao meu lado durante esta caminhada.

Aos meus pais, José e Vera, pelo apoio, carinho e incentivo para que conseguisse vencer cada etapa do meu Doutorado. Aos meus irmãos, Luciana e Guilherme, que sempre estavam ao meu lado participando efetivamente do meu trabalho. Aos meus avós, Reginaldo, Maria de Lourdes, Jovita, Jovelino (*in memorian*) e Dinha (*in memorian*), pelo carinho que sempre me deram. À minha tia Eni e minha prima Luiza pelo incentivo na conclusão do trabalho. Tenho certeza que sem minha família esta conquista não seria possível.

Ao meu namorado Thiago por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis e não deixar desistir e nem abalar com as dificuldades encontradas. Juntos enfrentamos muitos desafios e conseguimos vencer muitas batalhas.

À minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Landi Franco pela confiança e pelo crescimento profissional.

A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Maria Victória Eiras Grossmann pela ajuda e pelas sugestões que contribuíram com a pesquisa.

A professora Dr<sup>a</sup> Thaís de Souza Rocha pelas contribuições do trabalho de estrutura molecular dos nanocristais e pelas sugestões na banca de qualificação que enriqueceram o trabalho.

Ao professor Dr. Diogo Paschoalini Volanti pela ajuda nas análises de microscopia de transmissão e difração de raios-X dos nanocristais de amidos e pelas sugestões ao longo do trabalho que contribuíram para o artigo científico.

Aos professores Dr. Mauricio Boscolo, Dr. José Francisco Lopes Filho, Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Mouro, Dr<sup>a</sup> Márcia Cristina Bisinoti e Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Conti e Silva pela disponibilidade do laboratório para realização das análises.

Aos funcionários Alana, Tânia, Luiz, Ginaldo, Suely e Jesuíno pelo auxílio nas dificuldades do laboratório.

As minhas queridas e grandes amigas Vivian, Samara e Vanessa, vocês são muito especiais e estarão sempre ao meu lado.

Aos meus amigos Tatiane, Aline, Jefferson, Monique, André, Flávia C. e Débora que sempre me apoiaram e foram muito especiais durante esta caminhada.

Aos colegas do laboratório e pós-graduação: Márcia, Flávia, Marília, Jéssica, Jaqueline, Júlia, Samara, Bruna, Jessika Rossi, Olavo, Ana Maria, Liane Carolina, Pedro Lucas, Katieli, Sabrina, Lara e Thalita pelo companheirismo, ajuda, ensinamentos e convívio diário.

Um agradecimento especial ao Raul, Laís, Luzilene, Dr.<sup>a</sup> Crislene Barbosa de Almeida e Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Bilck (UEL) pela ajuda no desenvolvimento e realização das análises do biofilme.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São de Paulo pela concessão da bolsa de doutorado (Processo Fapesp: 2013/01500-7) e apoio financeiro à pesquisa (Processo Fapesp: 2014/04686-7).

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conquista deste título.

*“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”*

*Henry Ford*



## RESUMO

O efeito do padrão cristalino do amido na obtenção e na morfologia, características estruturais, moleculares e físico-químicas de nanocristais de amido (NCA) e sua aplicação em biofilmes foram estudados. Amidos de mandioca, milho e batata foram isolados e caracterizados. Suspensões de amido (14,7% p/v) em 3,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram hidrolisadas durante 1, 3, 5 e 7 dias a 40 °C. As amilodextrinas obtidas foram caracterizadas quanto ao teor de amilose (titulação potenciométrica), espectroscopia vibracional por refletância total atenuada (FTIR-ATR), padrão cristalino e cristalinidade relativa (difração de raios-X), propriedades térmicas (DSC), análise termogravimétrica, distribuição das cadeias de amilodextrinas por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), morfologia (MEV e MET) e tamanho (zetasiser). O amido de mandioca foi o mais suscetível à hidrólise devido às imperfeições na sua estrutura cristalina. Os padrões cristalinos das amilodextrinas mantiveram-se inalterados e a cristalinidade e as temperaturas de pico aumentaram com o tempo de hidrólise, enquanto a temperatura de degradação térmica diminuiu, independentemente do tempo de tratamento e da fonte de amido. As amilodextrinas (amidos de mandioca e milho) com padrão tipo A foram estrutural e termicamente mais estáveis que aquelas com padrão B (amido de batata), mas suas partículas tiveram maior tendência para aglomeração. NCA foram observados em MET a partir do terceiro dia de hidrólise nas amilodextrinas de mandioca, enquanto naquelas de milho e batata a partir do quinto dia. As amilodextrinas eram constituídas de duas estruturas com escalas micro- (partículas cristalinas) e nano- (organização das duplas hélices). Os NCA tipo A tiveram formato de plaquetas, enquanto os NCA tipo B eram redondos. NCA foram fracionados em coluna Bio-Gel P6 e frações de alto e baixo peso molecular foram coletadas. As frações I e III foram tratadas enzimaticamente (a: β-amilase seguido de isoamilase e pululanase; b: enzimas desramificantes seguido de β-amilase) e analisadas por HPAEC-PAD. Os NCA eram formados por duas populações de dextrinas compostas por cadeias lineares (grau de polimerização - GP 11-15) e

uniramificadas (GP 22-25). NCA tipo A continham cadeias internas mais longas ligadas aos pontos de ramificação, as quais ficaram protegidas durante a hidrólise. NCA, independente do padrão cristalino, eram constituídos de duplas hélices estáveis formadas por cadeias com GP 10-15, porém com características distintas: enquanto NCA tipo A continham maior quantidade de ramificações localizadas principalmente na extremidade redutora de sua estrutura, os NCA tipo B tinham menos ramificações que estavam localizadas na extremidade não-redutora. A localização dos pontos de ramificação na estrutura cristalina influenciou o formato dos NCA. NCA de batata obtidos após 5 e 7 dias (BA5 e BA7) e NCA de mandioca e milho obtidos após 3 (MA3 e MI3), 5 (MA5 e MI5) e 7 (MA7 e MI7) dias de hidrólise foram adicionados em biofilmes de amido de mandioca em diferentes proporções (0, 1, 3 e 5%) que foram caracterizados. Os filmes adicionados de NCA tiveram menor teor de umidade e maior solubilidade, independente do tipo cristalino e concentração de NCA, com exceção daqueles com NCA de MI3. A adição de NCA de BA5, BA7, MA3, MA5, MI3 e MI5, independente da concentração, reduziu a permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos biofilmes melhorando as propriedades de barreira, enquanto NCA de MA7 e MI7 provocaram aumento na PVA devido aglomeração das partículas. A análise de componentes principais permitiu agrupar as amostras em quatro grupos de acordo com as propriedades mecânicas. Filmes adicionados de NCA 3%BA5, 5%BA7, 3%MA5, 1%MI3 e 5%MI3 se destacaram dos demais por apresentar melhores propriedades de barreira e mecânicas. A morfologia dos NCA não influenciou as propriedades mecânicas, mas a dispersão das partículas na matriz polimérica e a estabilidade das superfícies dos cristais melhoraram as forças de tensão. NCA de MI3 na concentração de 1% foi o mais adequado para serem aplicados em filmes à base de amido.

**Palavras-chave:** nanopartículas, amido, estrutura, morfologia, biofilme

## **ABSTRACT**

*The effect of the crystalline pattern of starch on the obtainment and on the morphology, structural, molecular and physicochemical characteristics of starch nanocrystals (SNC) and their application in biofilms have been studied. The cassava, corn and potato starches were isolated and characterized. Suspensions of starch (14.7% w/v) in 3.16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were hydrolyzed for 1, 3, 5 and 7 days at 40 °C. The amyloextrins obtained were characterized regarding amylose content (potentiometric titration), attenuated total reflectance vibration spectroscopy (FTIR-ATR), crystalline pattern and relative crystallinity (X-ray diffraction), thermal properties (DSC), thermogravimetric analysis, distribution of amyloextrins chains in high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), morphology (SEM and TEM) and size (zetasizer). Cassava starch was the most susceptible to hydrolysis due to imperfections in its crystalline structure. The crystalline patterns of amyloextrins kept unchanged and crystallinity and peak temperature increased with hydrolysis time, while thermal degradation temperature decreased, independently of treatment time and starch source. A-type amyloextrins (cassava and corn starches) were structurally and thermally more stable than B-amyloextrins (potato starch), but their particles had a greater tendency to agglomeration. SNC were observed by TEM from the third day of hydrolysis in cassava amyloextrins, while corn and potato amyloextrins displayed SNC only on the fifth day. The amyloextrins were formed by two structures: micro- (crystalline particles) and nano- (organization of double helices). A-type SNC displayed platelet shapes, while B-type SNC were rounded. SNC were fractionated in column of Bio-Gel P6 and the fractions of the high and low molecular weight were collected. Fractions I and III were treated enzymatically (a: β-amylase followed by isoamylase and pullulanase; b: debranching enzymes followed by β-amylase) and analyzed by HPAEC-PAD. SNC were formed by two populations of dextrins compound by linear chains (degree of polymerization - DP 11-15) and single branched (DP 22-25). A-type SNC contained inner longer chains linked to the branching points, which were protected during acid action. SNC, regardless the*

*crystalline pattern, were compound by stable double helices formed by chains with DP 10-15, but with distinct characteristics: while SNC A-type contained a greater amount of branches located mainly in the reducing end of their structure, SNC B-type had fewer branches, which were located at the non-reducing end. The location of the branching points in the crystalline structure influenced the shape of the SNC. Potato SNC obtained after 5 and 7 days (PO5 and PO7) and cassava and corn SNC obtained after 3 (CA3 and CO3), 5 (CA5 and CO5) and 7 (CA7 and CO7) days of hydrolysis were added in biofilms of cassava starch in different proportions (0, 1, 3 and 5%) and were characterized. The films added of the SNC had lower moisture content and higher solubility, regardless the crystalline type and concentration of SNC, except for those added with CO3 SNC. The addition of SNC of PO5, PO7, CA3, CA5, CO3 and CO5, regardless concentration, reduced the water vapour permeability (WPV) of the biofilms by improving the barrier properties, while the CA7 and CO7 SNC caused increase in the WPV due to particle agglomeration. Principal component analysis allowed to group the samples into four groups according to the mechanical properties. Films added by SNC 3%PO5, 5%PO7, 3%CA5, 1%CO3 and 5%CO3 were distinguished the other SNC for presenting better barrier and mechanical properties. The morphology of the SNC did not influence the mechanical properties, but the dispersion of the particles in the polymer matrix and the stability of the crystal surfaces improved the tensile forces. The CO3 SNC at 1% concentration was the most suitable to be applied in starch-based films.*

*Keywords: nanoparticles, starch, structure, morphology, biofilm.*

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I**

**25**

- Figura 1** – A) Classificação das cadeias da amilopectina. B) Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido. C) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com visualização dos anéis de crescimento e hilum. (PARKER; RING, 2001) ..... 28
- Figura 2** – Ilustração das frações da cadeia de amilopectina (HIZUKURI, 1986)..... 29
- Figura 3** – Configuração da estrutura cristalina tipo A e B (BULÉON et al., 1998) ... 30
- Figura 4** – Estrutura química da (a) amilose e (b) amilopectina. .... 32
- Figura 5** – Mecanismo da hidrólise ácida do amido (HOOVER, 2000)..... 36
- Figura 6** – Mecanismo de transição polimórfica durante a hidrólise ácida (a) polimorfismo de A para B e (b) polimorfismo de B para A proposto por Wang e Copeland (2015) ..... 40
- Figura 7** – Primeira observação de nanocristais em MET. a) vista longitudinal b) vista planar. (PUTAUX et al., 2003)..... 42
- Figura 8** – Nanocristais obtidos por diferentes métodos de hidrólise em a) ácido sulfúrico b) hidrólise em ácido clorídrico (LECORRE, 2011)..... 43

### **CAPÍTULO II**

**60**

- Figura 1** – Distribuição normalizada do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioca, milho e batata desramificados com isoamilase, determinada por HPAEC-PAD..... 75
- Figura 2** – Perfil viscoamilográfico dos amidos de mandioca, milho e batata..... 77
- Figura 3** – Porcentagem de hidrólise em função do tempo dos amidos de mandioca, milho e batata incubados a 40 °C durante 10 dias ..... 79
- Figura 4** – Teor de amilose aparente dos amidos de mandioca, milho e batata durante a hidrólise ácida..... 81



<b>Figura 5</b> – FTIR-ATR dos amidos e amilodextrinas. (A): mandioca; (B): milho; (C): batata.....	82
<b>Figura 6</b> – Difractogramas de raios-X e cristalinidade relativa dos amidos nativos (N) e das amilodextrinas de mandioca, milho e batata obtidas após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise.....	83
<b>Figura 7</b> – Análise termogravimétrica dos amidos e amilodextrinas de mandioca, milho e batata .....	87
<b>Figura 8</b> – Cromatogramas HPAEC-PAD das amilodextrinas de mandioca, milho e batata obtidas a 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise .....	89
<b>Figura 9</b> – Distribuição do tamanho dos diâmetros maiores e menores de grânulos de amido de mandioca, milho e batata .....	92
<b>Figura 10</b> – Micrografias dos amidos de mandioca (a), milho (f) e batata (k). amilodextrinas de mandioca (b-e), milho (g-j) e batata (l-o) após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise.....	93
<b>Figura 11</b> – Micrografias de MET dos nanocristais de mandioca (a-c), milho (d-f) e batata (g-i) após 3, 5 e 7 dias de hidrólise.....	95
<b>Figura 12</b> – Micro- e nano-estruturas das amilodextrinas com padrão tipo A e B.....	96



### **CAPÍTULO III**

**103**

<b>Figura 1</b> – Perfis de eluição dos NCA de batata, mandioca e milho obtidos por cromatografia de permeação em Bio-Gel P6.....	110
<b>Figura 2</b> – Esquema dos tratamentos enzimáticos das frações I e III dos NCA.....	111
<b>Figura 3</b> – Cromatogramas HPAEC-PAD dos NCA e das frações I, III e IV de batata, mandioca e milho .....	114
<b>Figura 4</b> – Concentração molar relativa das frações I e III dos NCA de batata, mandioca e milho antes (barras) e após a desramificação (linha vermelha).....	118
<b>Figura 5</b> – Cromatograma HPAEC-PAD das frações I e III dos NCA de batata, mandioca e milho desramificados e hidrolisados por $\beta$ -amilase .....	121
<b>Figura 6</b> – Cromatogramas HPAEC-PAD das frações I e III hidrolisadas por $\beta$ -amilase.....	124

**Figura 7** – Cromatogramas HPAEC-PAD das frações I e III hidrolisadas por  $\beta$ -amilase seguida da desramificação..... 126

**Figura 8** – Estrutura molecular dos NCA tipo A. (1) maltose e maltotriose; (2) duplas hélices ligadas aos pontos de ramificação; (3) dextrinas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e enzimas desramificantes; (4) estruturas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e resistentes às enzimas desramificantes; (5) cadeias uniramificadas.  Extremidade redutora.  Extremidade não-redutora. — Ligação ramificada ..... 129

**Figura 9** – Estrutura molecular dos NCA tipo B. (1) maltose e maltotriose; (2) duplas hélices ligadas aos pontos de ramificação; (3) dextrinas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e enzimas desramificantes; (4) estruturas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e resistentes às enzimas desramificantes; (5) cadeias uniramificadas.  Extremidade redutora.  Extremidade não-redutora. — Ligação ramificada ..... 130

## **CAPÍTULO IV**

**136**

**Figura 1** – Cápsulas utilizadas na permeabilidade ao vapor d'água..... 143

**Figura 2** – Distribuição do tamanho da solução de NCA de batata, mandioca e milho 147

**Figura 3** – Drifactogramas de raios-X dos filmes adicionados de NCA..... 152

**Figura 4** – Análise de componentes principais das propriedades mecânicas dos filmes de amido adicionados de NCA ..... 157

**Figura 5** – Isotermas de adsorção dos filmes controle e adicionados de NCA (grupo I e II) ..... 159

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO II** **60**

---

<b>Tabela 1</b> – Composição química <sup>a</sup> dos amidos isolados.....	73
<b>Tabela 2</b> – Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioca, milho e batata determinada por HPAEC-PAD .....	76
<b>Tabela 3</b> – Cristalinidade relativa dos amidos e das amilodextrinas após 1, 3 e 5 dias de hidrólise .....	84
<b>Tabela 4</b> – Propriedades térmicas dos amidos e das amilodextrinas obtidas em diferentes dias de hidrólise .....	86
<b>Tabela 5</b> – Relação entre as cadeias uniramificadas e cadeias lineares das amilodextrinas obtidas após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise .....	90

### **CAPÍTULO III** **103**

---

<b>Tabela 1</b> – Concentração molar relativa (mol %) dos NCA de batata, mandioca e milho e suas frações I e III .....	115
<b>Tabela 2</b> – Caracterização das frações I e III dos NCA após diferentes tratamentos enzimáticos e analisadas por HPAEC-PAD .....	120

### **CAPÍTULO IV** **136**

---

<b>Tabela 1</b> – Espessura, umidade e solubilidade filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações .....	149
<b>Tabela 2</b> – Permeabilidade ao vapor d' água dos filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações .....	151
<b>Tabela 3</b> – Cristalinidade relativa dos filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações.....	153
<b>Tabela 4</b> – Propriedades mecânicas de filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações .....	155
<b>Tabela 5</b> – Parâmetros do modelo de GAB ajustados às isotermas dos filmes controle e adicionados de NCA (Grupo I e II) .....	160



## Sumário

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>OBEJTIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>23</b>
<b>APRESENTAÇÃO DO TRABALHO</b> .....	<b>24</b>
<b><u>CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica</u></b> .....	<b>25</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>26</b>
<b>1.1. Amido</b> .....	<b>26</b>
1.1.1. Amilose.....	26
1.1.2. Amilopectina.....	27
1.1.3. Estrutura cristalina.....	29
1.1.4. Estrutura granular do amido .....	31
1.1.5. Componentes menores.....	32
1.1.6. Gelatinização e retrogradação.....	33
<b>1.2. Fontes de amidos</b> .....	<b>35</b>
<b>1.3. Hidrólise ácida</b> .....	<b>35</b>
<b>1.4. Nanotecnologia</b> .....	<b>41</b>
<b>1.5. Nanocristais</b> .....	<b>41</b>
1.5.1. Aplicação dos nanocristais .....	45
<b>1.6. Biofilmes a base de amido</b> .....	<b>46</b>
1.6.1. Propriedades de barreira .....	47
1.6.2. Propriedades mecânicas.....	48
1.6.3. Aplicação de nanocristais de amido em biofilmes .....	49
<b>2. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b><u>CAPÍTULO II: Características estruturais, térmicas e morfológicas de amilodextrinas de mandioca, milho e batata</u></b> .....	<b>60</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>61</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>

<b>2.1. Materiais</b> .....	64
<b>2.2. Métodos</b> .....	64
2.2.1. Isolamento dos amidos .....	64
2.2.2. Caracterização dos amidos nativos .....	65
2.2.2.1. <i>Composição química dos amidos nativos</i> .....	65
2.2.2.2. <i>Distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina</i> .....	66
2.2.2.3. <i>Propriedades de pasta</i> .....	67
2.2.3. Hidrólise ácida dos amidos .....	67
2.2.3.1. <i>Afinidade por iodo e teor de amilose aparente</i> .....	68
2.2.3.2. <i>Análise por espectroscopia vibracional por reflectância total atenuada (FTIR-ATR)</i> .....	69
2.2.3.3. <i>Difração de raios-X e cristalinidade relativa</i> .....	69
2.2.3.4. <i>Propriedades térmicas</i> .....	69
2.2.3.5. <i>Análise termogravimétrica</i> .....	70
2.2.3.6. <i>Distribuição de cadeias das amilodextrinas</i> .....	70
2.2.3.7. <i>Morfologia e distribuição de tamanho dos grânulos de amido e amilodextrinas</i> .....	71
2.2.4. Análise estatística.....	72
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>3.1. Caracterização dos amidos</b> .....	72
3.1.1. Composição química dos amidos.....	72
3.1.2. Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina .....	75
3.1.3. Propriedades de pasta .....	77
<b>3.2. Hidrólise ácida dos amidos</b> .....	78
3.2.1. Afinidade por iodo e teor de amilose aparente .....	80
3.2.2. Análise por espectroscopia vibracional por reflectância total atenuada (FTIR-ATR) .....	81
3.2.3. Padrão de raios-X e cristalinidade relativa .....	83
3.2.4. Propriedades térmicas.....	85
3.2.5. Propriedades termogravimétrica .....	87
3.2.6. Distribuição do comprimento de cadeias das amilodextrinas.....	88

3.2.7. Morfologia dos grânulos e distribuição do tamanho de grânulos de amido e amilodextrinas .....	91
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

**CAPÍTULO III: Diferentes padrões cristalinos influenciam a organização molecular de nanocristais de amido** **103**

<b>RESUMO .....</b>	<b>104</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>107</b>
<b>2.1. Materiais .....</b>	<b>107</b>
<b>2.2. Métodos .....</b>	<b>108</b>
2.2.1. Obtenção dos nanocristais de amido .....	108
2.2.2. Distribuição das cadeias dos NCA determinada por HPAEC-PAD .....	108
2.2.3. Distribuição dos componentes moleculares dos NCA por cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	109
2.2.4. Tratamento enzimático das frações obtidas por GPC .....	110
2.2.4.1. <i>Composição das frações I e III antes e após tratamentos enzimáticos determinada por HPAEC-PAD .....</i>	<i>112</i>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
<b>3.1. Composição das cadeias de alto e baixo peso molecular dos NCA determinada por GPC .....</b>	<b>113</b>
<b>3.2. Tratamento enzimático das frações I e III obtidas por GPC.....</b>	<b>117</b>
3.2.1. Ação das enzimas desramificantes seguidas da $\beta$ -amilase .....	117
3.2.2. Ação da $\beta$ -amilase seguida da desramificação.....	122
<b>3.3. Organização molecular dos NCA com padrões cristalinos A e B e influencia na sua morfologia.....</b>	<b>126</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>131</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>

**CAPÍTULO IV: Propriedades mecânicas e de barreira de filmes à base de amido de mandioca reforçados com nanocristais de batata, mandioca e milho** **136**

<b>RESUMO</b> .....	137
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	138
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	140
<b>2.1. Materias</b> .....	140
<b>2.2. Métodos</b> .....	140
2.2.1. Preparo de nanocristais de amido.....	140
2.2.1.1. <i>Tamanho das nanopartículas</i> .....	141
2.2.2. Testes preliminares dos biofilmes .....	141
2.2.3. Processamento dos biofilmes .....	141
2.2.3.1. <i>Espessura</i> .....	142
2.2.3.2. <i>Umidade</i> .....	142
2.2.3.3. <i>Solubilidade</i> .....	142
2.2.3.4. <i>Permeabilidade ao vapor d'água</i> .....	143
2.2.3.5. <i>Cristalinidade relativa</i> .....	144
2.2.3.6. <i>Propriedades mecânicas</i> .....	144
2.2.3.7. <i>Isoterma de sorção</i> .....	145
2.2.4. Análise estatística .....	145
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	146
<b>3.1. Tamanho das partículas</b> .....	146
<b>3.2. Testes preliminares</b> .....	147
<b>3.3. Características dos biofilmes adicionados dos NCA</b> .....	148
3.3.1. Espessura, umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água .....	148
3.3.2. Cristalinidade dos filmes .....	152
3.3.3 Propriedades mecânicas .....	154
3.3.4. Isoterma de sorção .....	158
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	160
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	161
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	165

## INTRODUÇÃO GERAL

Polissacarídeos, como amido, celulose e proteínas quitina são fontes de recursos renováveis, biodegradáveis e de baixo custo. Entre eles, o amido é, provavelmente, o material mais promissor para produção de embalagens, filmes comestíveis, sacos de lixo, entre outros, por ser o biopolímero mais barato e totalmente biodegradável.

O amido é biosintetizado como grânulos semicristalinos com diferentes tipos polimórficos e grau de cristalinidade. Os grânulos de amido apresentam estruturas cristalinas com padrões de difração de raios-X tipo A, B e C, variando com a fonte botânica. Os nanocristais são obtidos da hidrólise ácida do amido granular, em que as áreas amorfas do grânulo são hidrolisadas e as áreas cristalinas são liberadas resultando em nanocristais, os quais terão propriedades físico-químicas e estruturais dependentes da fonte botânica do amido. Devido à forma e às dimensões dos nanocristais, esses podem ser aplicados em matriz de polímeros sintéticos e em biofilmes para melhorar sua resistência mecânica e permeabilidade ao vapor d' água e aos gases.

Os biofilmes à base de amido apresentam caráter hidrofílico e, com isso, estes filmes possuem baixas propriedades de barreira ao vapor d' água, a gases como CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> e as propriedades mecânicas também são fator limitante quando comparadas a de filmes sintéticos. A adição de nanocristais de amido em biofilmes a base de amido melhora as propriedades mecânicas e, principalmente a permeabilidade ao vapor d' água e aumenta a estabilidade térmica.

Amidos com diferentes padrões cristalinos apresentam diferenças em sua estrutura granular e molecular e influenciam a hidrólise ácida. Desse modo, nanocristais com tamanhos, forma e características estruturais e físico-químicas diferentes podem ser obtidos. Para a realização deste projeto, os amidos foram escolhidos de acordo com os padrões cristalinos descritos na literatura. Com isso, amidos de mandioca (tipo A), milho normal (tipo A), e batata (tipo B) foram selecionados.

Este trabalho foi estruturado em três partes, sendo que na primeira foi realizado o isolamento e caracterização dos amidos e a determinação das características estruturais, térmicas e morfológicas das amilodextrinas de mandioca, milho e batata. Os resultados mostraram que as amilodextrinas eram compostas por duas estruturas micro-

e nano- e o formato dos nanocristais foram correlacionados com o arranjo cristalino padrão cristalino tipo A e B. Corroborando com os resultados obtidos na primeira parte do trabalho, a estrutura molecular dos nanocristais de batata, mandioca e milho, obtidos após cinco dias de hidrólise, foi estudada e verificou-se que a quantidade e a localização dos pontos de ramificação na região cristalina da estrutura determinaram o formato dos nanocristais. E por fim na terceira parte do trabalho os nanocristais de batata obtidos após 5 e 7 dias e de mandioca e milho obtidos após 3, 5 e 7 dias de hidrólise foram adicionados em filmes de amido de mandioca nas concentrações de 0, 1, 3 e 5%. Foram determinadas as propriedades de barreira e mecânicas desses filmes para avaliar quais os tipos de nanocristais eram mais adequados para a produção de biofilmes.

## **OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do padrão cristalino do amido na obtenção e características estruturais, moleculares e físico-químicas de nanocristais e sua aplicação em biofilmes.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar físico-química, morfológica e estruturalmente os amidos e as amilodextrinas obtidas da hidrólise ácida dos amidos em diferentes tempos.
- Analisar a organização molecular dos nanocristais de amido obtidos após cinco dias de hidrólise.
- Avaliar as propriedades mecânicas e de barreira de filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais.

## **APRESENTAÇÃO DO TRABALHO**

Este trabalho está organizado em quatro capítulos para melhor distribuição e compreensão dos assuntos abordados:

Capítulo I: compreende a revisão bibliográfica do tema abordado.

Capítulo II: consiste no estudo das características estruturais, térmicas e morfológicas das amilodextrinas de mandioca, milho e batata.

Capítulo III: compreende o estudo da estrutura molecular dos nanocristais com diferentes padrões cristalinos (A e B) e a influencia dessas estruturas na morfologia dos nanocristais.

Capítulo IV: compreende o estudo do efeito dos nanocristais de amido de batata, mandioca e milho obtidos em diferentes tempos de hidrólise nas propriedades de barreira e mecânicas em biofilmes à base de amido de mandioca.



# Capítulo I

*Revisão Bibliográfica*

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Amido

Amido é um polissacarídeo constituído de duas macromoléculas: amilose, molécula predominantemente linear, constituída de resíduos de glicose ligados em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4); amilopectina, molécula altamente ramificada constituída de resíduos de glicose ligados em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) com ramificação em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (FRENCH, 1973; BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

#### 1.1.1. Amilose

A amilose é um polímero essencialmente linear formado por unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), com poucas ramificações (0,1 a 2,2 %) em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (BULÉON et al., 1998). A massa molecular desse polímero é variável com a fonte botânica e as condições de processamento empregadas na extração do amido, podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose (WURZBURG, 1986) com massa molecular na ordem de 250.000 Daltons (DENARDIM; SILVA, 2009).

De acordo com Buléon et al. (1998) essas ramificações separadas por grandes distâncias, permitem às moléculas de amilose ramificadas agirem como se fossem lineares não alterando seu comportamento em solução em relação às moléculas de amilose lineares.

A amilose encontra-se na forma de hélice. No interior da hélice encontra-se a parte lipofílica, devido ao revestimento de grupos metileno e oxigênios glicosídicos, enquanto na parte externa encontram-se as hidroxilas (TESTER, 1997). Nos amidos de cereais a amilose pode estar presente no grânulo de amido como amilose livre de lipídeos ou na forma de complexos amilose-lipídeo. Esses complexos podem afetar as propriedades estruturais e tecnológicas dos grânulos de amidos (TESTER, 1997; COPELAND et al., 2009).

Diversos estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos para saber a localização da amilose dentro dos grânulos de amido. De acordo com Blanshard (1987)

dependendo da origem botânica de amido, a amilose tem sido encontrada na região amorfa (amido de trigo), em feixes entre os *clusters* da amilopectina, ou intercaladas entre os *clusters* nas regiões amorfas e cristalinas (amido de milho normal). No entanto, foi demonstrada através de experiências de reticulação utilizando o amido de milho, que a amilose não forma ligações cruzadas com outra molécula (KASEMSUWAN; JANE, 1994). Jane e Shen (1993) observaram em amido de batata que as moléculas de amilose que se encontravam no núcleo dos grânulos eram significativamente maiores que as moléculas de amilose da região periférica.

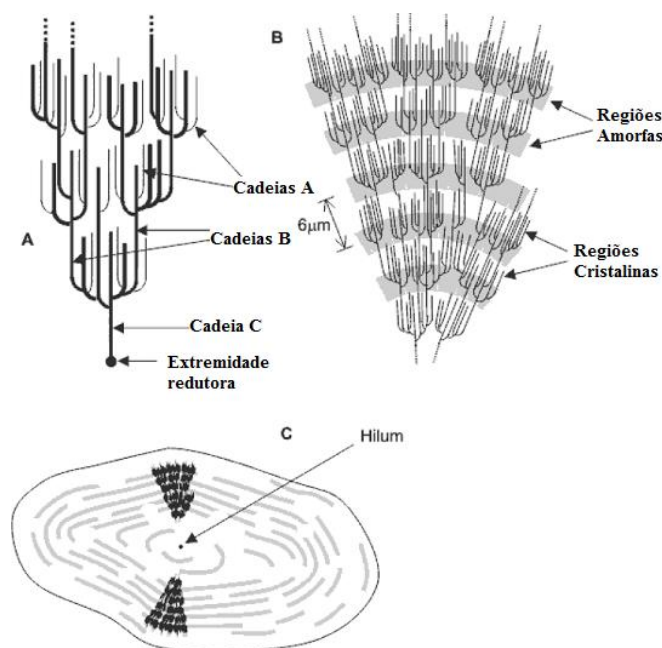
Já Jane (2006) verificou que a amilose é comumente encontrada entremeadada e entrelaçada com a amilopectina, mas também pode ser separada da amilopectina e se apresentar em feixes, porém quando estão juntas é a amilose que mantém as moléculas de amilopectina unidas durante a transição térmica, mantendo, assim a integridade dos grânulos de amido. A molécula de amilose se encontra em maior concentração na periferia dos grânulos, enquanto a amilopectina é distribuída em todo grânulo.

### 1.1.2. Amilopectina

A amilopectina é o componente ramificado do amido, sendo formada por unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e com 5 a 6 % de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) nos pontos de ramificações (BULÉON et al., 1998). A massa molecular da amilopectina varia de 50 a 500x10<sup>6</sup> Daltons (LAJOLO; MENEZES, 2006) e seu grau de polimerização varia de 4700 a 12800 unidades de resíduos de glicose (VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004).

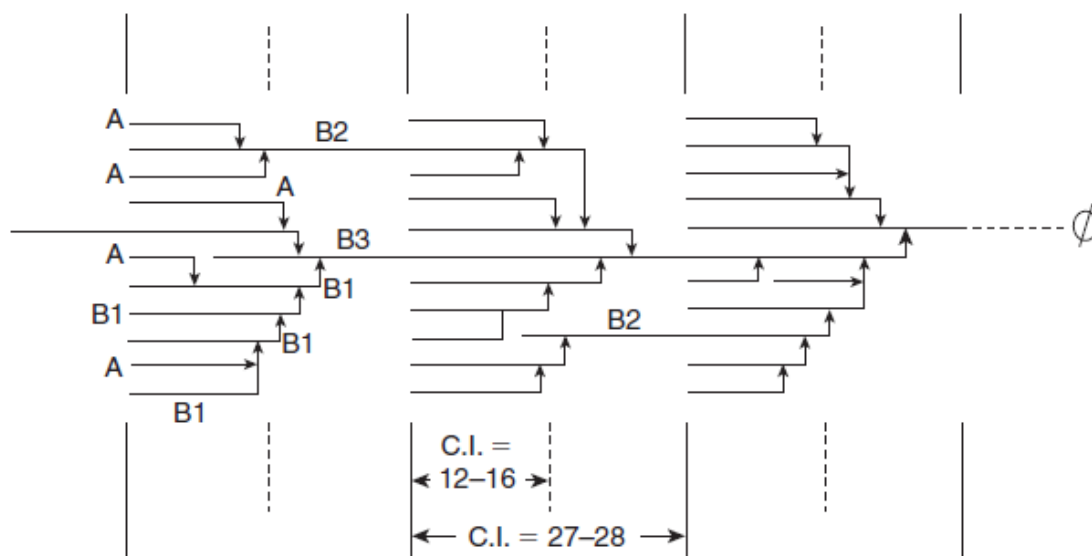
A organização das cadeias de amilopectina é baseada em um modelo de *cluster* e na identificação das cadeias A, B e C. As cadeias A ficam nas regiões periféricas da molécula e podem ser conectadas às cadeias B ou C via ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), mas não carregam qualquer ramificação. As cadeias B são ramificadas, podem ser conectadas a outras cadeias por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), possuem uma ou mais cadeias A e B ligadas nos pontos de ramificação. Elas podem ser classificadas como B1-B4 dependendo do número de *clusters* em que a cadeia toma parte (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). A cadeia C carrega o grupo redutor do polissacarídeo, e, numerosas ramificações

(FRENCH, 1973; ROBIN et al., 1974). Cada *cluster* possui uma região com pontos de ramificação (área amorfa) e uma região com segmentos curtos da cadeia de amilopectina que forma duplas hélices (área cristalina) (BALL et al., 1996; SMITH; DENYER; MARTIN, 1997). Um esquema com a classificação das cadeias da amilopectina, sua estrutura em *clusters* e o modelo da estrutura interna do grânulo de amido é apresentada na Figura 1.



**Figura 1** - A) Classificação das cadeias da amilopectina. B) Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido. C) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com a visualização dos anéis de crescimento e hilum (PARKER; RING, 2001).

Hizukuri (1986) investigou a distribuição de comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com monitoramento fotométricos de dispersão da luz laser e refratometria diferencial. Os resultados da amilopectina desramificada mostraram uma distribuição polimodal das cadeias com cinco populações (A, B1, B2 e B3). A fração A correspondeu as cadeias A, enquanto as cadeias B, representadas por B1, B2 e B3 se estendem ao longo dos *clusters* 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Figura 2).



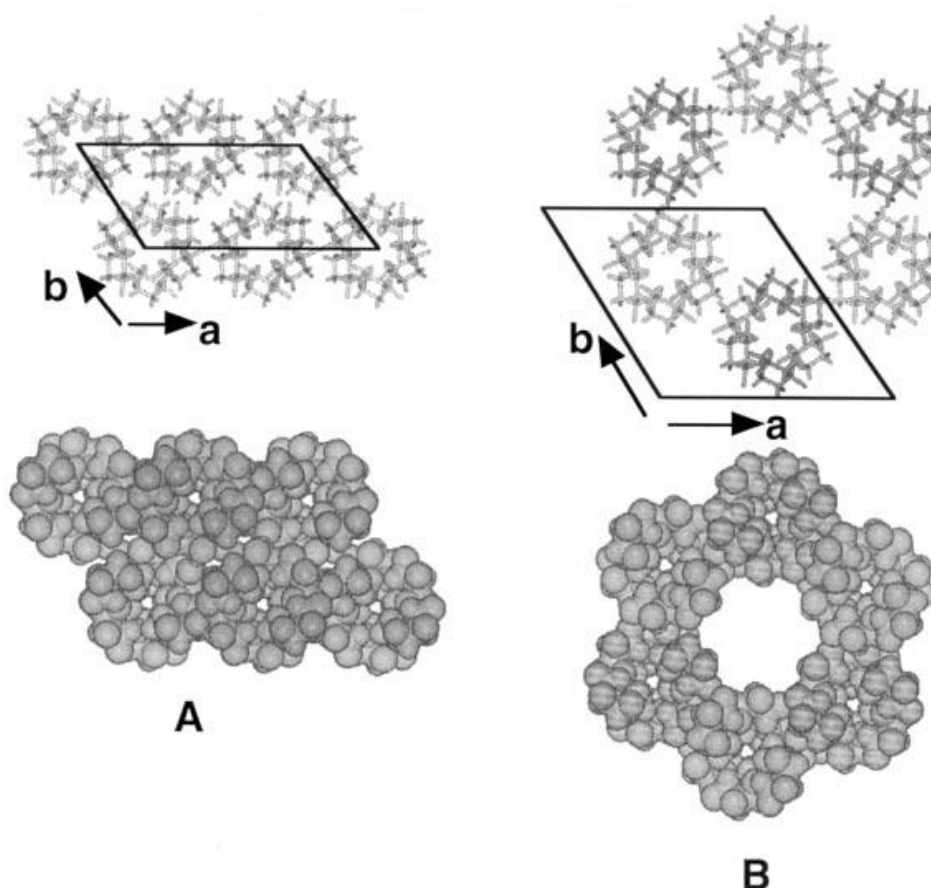
**Figura 2** – Ilustração das frações da cadeia de amilopectina (HIZUKURI, 1986).

Segundo Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996), as cadeias A apresentam grau de polimerização (GP) variando de 6 a 12, enquanto as cadeias B1, B2 e B3 têm GP de 13 a 24, 25 a 36, e  $\geq 37$ , respectivamente.

### 1.1.3. Estrutura cristalina

Os amidos nativos apresentam cristalinidade variando entre 15 e 45% dependendo da fonte botânica (CHEETHAM; TAO, 1998). Os grânulos de amido possuem diferentes tipos de cristalinidade, exibindo padrões de raios-X tipo A, B e C, dependendo do comprimento de cadeia da amilopectina (HIZUKURI, 1985; JANE, 2006). O amido com padrão tipo A apresenta em sua estrutura uma célula unitária monocíclica com empacotamento fechado. O padrão tipo B apresenta uma célula unitária hexagonal, com uma cavidade no seu eixo central, quando projetada no plano (IMBERTY et al., 1991). No padrão tipo A as duplas hélices formadas pelas cadeias laterais da amilopectina são empacotadas em uma estrutura formado por uma célula monocíclica unitária contendo 8 moléculas de água para cada célula unitária. No padrão tipo B as duplas hélices são empacotadas em uma estrutura formada por uma célula unitária hexagonal com 36 moléculas de água por célula unitária, como apresentado na

Figura 3 (BULÉON et al., 1998). O padrão tipo C consiste na combinação das células unitárias dos tipos A e B (JANE, 2006).



**Figura 3** – Configuração da estrutura cristalina tipo A e tipo B (BULÉON et al., 1998).

Segundo Jane (2006) amidos com polimorfismo tipo A apresentam maiores proporções de cadeias ramificadas curtas e aqueles com o tipo B maiores proporções de cadeias ramificadas longas com extensão em 2 ou mais *clusters*, mas também, possuem altas proporções de cadeias curtas. O polimorfismo tipo C apresenta a mistura das estruturas dos tipos A e B, portanto apresenta em sua estrutura cadeias curtas e longas.

Devido à proporção de cadeias curtas e longas, o amido com padrão tipo A apresenta maior número de ramificações que aqueles com o padrão tipo B (HIZUKURI, 1985). No entanto, as ramificações são mais dispersas, e algumas estão localizadas na região cristalina, as quais ficam protegidas durante a hidrólise ácida. Com as ramificações dispersas, o amido com padrão tipo A apresenta distância mais curta entre

os pontos de ramificação do que o amido com padrão tipo B. Este fato sugere que a estrutura tipo A possui cadeias mais curtas, formando uma estrutura cristalina inferior. Essa estrutura, contendo os pontos de ramificações e duplas hélices de cadeias curtas, é, portanto, mais susceptível à hidrólise enzimática devido aos “pontos fracos” dos grânulos de amido com padrão tipo A (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006). Essa estrutura também promove mais flexibilidade ao empacotamento das duplas hélices e menos barreira entrópica para o arranjo das duplas hélices que podem com isso, formar uma célula unitária mais densa. Nos amidos com padrão tipo B a maioria das ramificações estão aglomeradas na região amorfa, sendo as mesmas mais susceptíveis à hidrólise ácida. Essas estruturas, com ramificações aglomeradas e relativamente menos cadeias curtas, podem desenvolver uma estrutura cristalina mais estável, semelhante à estrutura derivada das moléculas de amilose retrogradada (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006).

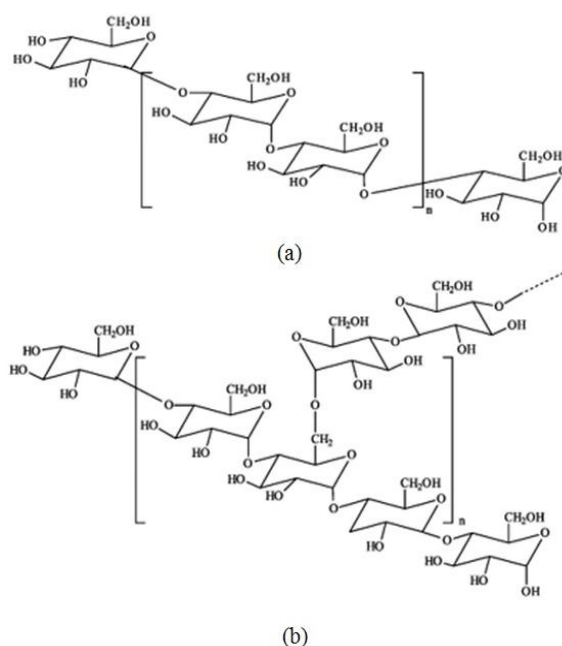
#### 1.1.4. Estrutura granular do amido

O amido é sintetizado em uma estrutura semicristalina granular. Estruturalmente, o amido consiste de resíduos de  $\alpha$ -D-glicose, sendo considerado um homopolissacarídeo composto por dois tipos de  $\alpha$ -glucanas, amilose e amilopectina (Figura 4), as quais representam 98-99 % do seu peso seco (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; BULÉON et al., 1998). A proporção de amilose e amilopectina é de 1:3 para a maioria dos amidos, sendo variável com a fonte botânica, variedade de uma mesma espécie e de acordo com o grau de maturação (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Os amidos de diferentes fontes botânicas possuem diferentes tamanhos granulares, morfologia, polimorfismo e digestibilidade enzimática, sendo que essas características estão relacionadas com a disposição da amilopectina e amilose na estrutura do grânulo (JANE, 2006).

Os grânulos do amido apresentam uma estrutura hierárquica que pode ser observada em microscopia óptica e eletrônica. As múltiplas camadas concêntricas dos anéis de crescimento se estendem do hilum (o centro de crescimento) até a superfície dos grânulos. Nesses anéis de crescimento estão alternadas as regiões cristalinas e

amorfas (COPELAND et al., 2009). Dentro das lamelas, as camadas cristalinas concêntricas são formadas quando as duplas hélices da amilopectina se empacotam de forma ordenada, enquanto que as camadas amorfas contêm moléculas de amilose e amilopectina em uma conformação desordenada (JANE, 2007; COPELAND et al., 2009). Devido ao denso empacotamento das estruturas semicristalinas dos grânulos de amido, os amidos são insolúveis em água a temperatura ambiente (JANE, 2006).



**Figura 4** – Estrutura química da (a) amilose e (b) amilopectina.

#### 1.1.5. Componentes menores

Os componentes secundários associados ao amido em pequenas quantidades são compostos por proteínas, lipídeos e cinzas (minerais e sais). Os lipídeos representam a fração mais importante associada aos grânulos de amido. Altos conteúdos de lipídeos são geralmente observados em amidos de cereais como trigo (0,8 – 1,2 %) e milho normal (0,6 – 0,8 %). Os amidos de cereais são caracterizados pela presença de ácidos graxos livres (AGL) e lisofosfolídeos (LFL), os quais são positivamente correlacionados com o teor de amilose (MORRISON; LAW; SNAPE, 1993). Os amidos de trigo, cevada, centeio e triticale contêm altos teores de LFL, enquanto outros



cereais apresentam quase exclusivamente AGL (BULÉON et al., 1998). Os monoacil lipídeos induzem a formação do complexo amilose-lipídeo durante a gelatinização. Esse complexo restringe a dispersão, o inchamento do grânulo dos amidos e a solubilização da amilose, gerando pastas opacas com viscosidade reduzida e altas temperaturas de pastas (BULÉON et al., 1998).

Os amidos apresentam pequenas quantidades de minerais os quais não interferem nas suas propriedades funcionais, com exceção do fósforo que desempenha um importante papel nas suas propriedades funcionais (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994). O fósforo pode ser encontrado em três formas principais: monoésteres de fosfatos, fosfolipídeos e fosfatos inorgânicos (KASEMSUWAN; JANE, 1996; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Nos amidos de cereais o fósforo se encontra na forma de LFL, que pode se complexar com a amilose reduzindo a capacidade de ligação do amido com a água tornando suas pastas mais opacas e menos viscosas. Já nos amidos de raízes e tubérculos, ele se apresenta na forma de monoésteres de fosfato propiciando a natureza hidrofílica do amido, por introduzir grupos fosfatos carregados negativamente nas cadeias de amido aumentando sua capacidade de ligação com a água e poder de inchamento, sendo uma vantagem para muitas aplicações industriais (TESTER; MORRISON, 1990; BLENNOW et al., 2000; FRANCO et al., 2001; HOOVER, 2001).

#### 1.1.6. Gelatinização e retrogradação

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria, mas quando aquecidos, sofrem um inchamento irreversível, produzindo uma pasta viscosa (WHISTLER; BEMILLER, 1997). Esse fenômeno, chamado de gelatinização, ocorre durante o aquecimento do amido em excesso de água, causando a perda da cristalinidade e da organização estrutural dos grânulos (COPELAND et al., 2009).

A gelatinização inicia no hilum e se expande para a periferia, ocorrendo inicialmente nas regiões amorfas onde as ligações de hidrogênio são mais fracas. Quando a estrutura cristalina é rompida, as moléculas de água expõem seus grupos hidroxil formando ligações de hidrogênio entre a amilose e amilopectina, causando um

aumento no inchamento e na solubilidade do grânulo (SINGH et al., 2003). À medida que os grânulos de amido incham, ocorre a ruptura dos mesmos e a amilose é lixiviada resultando em um aumento na viscosidade (COPELAND et al., 2009).

O poder de inchamento e a solubilidade variam com a fonte do amido, evidenciando a interação entre as cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos. O poder de inchamento e as propriedades de gelatinização são controlados, em parte, pela massa molecular e comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina (unidade, extensão da ramificação, massa molecular e polidispersão), composição do amido (proporção de amilose e amilopectina, conteúdo de fósforo) e arquitetura dos grânulos (proporção de regiões cristalinas e amorfas) (SINGH et al., 2003).

A retrogradação consiste em transformações que ocorrem durante o resfriamento e armazenamento das pastas de amido gelatinizado. É o processo que ocorre quando as moléculas de amido gelatinizadas começam a reassociar favorecendo uma estrutura mais ordenada. Sob condições favoráveis, esta estrutura ordenada pode se desenvolver em forma cristalina (ATWELL, 1988). A forte interação das cadeias entre si promove a saída de água do sistema, sendo essa expulsão chamada de sinérese (DENADIN; SILVA, 2009).

A retrogradação é um processo contínuo que ocorre por um período prolongado. As características de retrogradação da amilose e amilopectina são cineticamente diferentes. A amilose retrograda rapidamente, reassociando com moléculas de amilose adjacentes por meio de ligações de hidrogênio, formando uma estrutura cristalina de dupla hélice. A amilose apresenta uma endoterma de fusão de 140 a 180 °C (DENADIN; SILVA, 2009). A amilopectina retrograda mais lentamente e é caracterizada pela formação de regiões cristalinas em função da associação das ramificações de cadeias curtas e sua endoterma de fusão é menor, aproximadamente de 45 a 60 °C (PARKER; RING, 2001; DENADIN; SILVA, 2009). A retrogradação é influenciada pela temperatura e tempo de armazenamento, pH, fonte de amido, presença de outros componentes (lipídeos, açúcares e eletrólitos) e condições de processamento. A principal influência da retrogradação é observada na textura, na aceitabilidade e na digestibilidade dos alimentos que contêm amido (ELIASSON, 2004).

## 1.2. Fontes de amidos

O amido se encontra distribuído em diversos vegetais como carboidrato de reserva, sendo amplamente distribuído em grãos de cereais (40 a 90 % do peso seco), leguminosas (30 a 50 % do peso seco), tuberosas (65 a 85 % do peso seco) e frutas imaturas (40 a 70 % do seu peso seco) (LAJOLO; MENEZES, 2006). Dentre os amidos de diferentes fontes botânicas, os amidos de milho, mandioca e batata são os de maior interesse comercial (SANTACRUZ et al., 2002).

O amido de milho tem como característica grânulos arredondados com formatos poligonais e com diâmetro variando de 12 a 15  $\mu\text{m}$ . Esse amido tem padrão de raios -X tipo A e teor de amilose que varia de 25 a 29%, dependendo da espécie, condições climáticas e de cultivo (VERMEYLEN et al., 2004)

O amido de mandioca apresenta grânulos arredondados, sendo que alguns apresentam uma extremidade côncava que se estende a um hilo excêntrico muito bem definido. Esses grânulos apresentam um diâmetro que varia de 3-30  $\mu\text{m}$ . O teor de amilose varia de 17 a 30%, dependendo da espécie, condições climáticas e de cultivo. O amido de mandioca apresenta cristalinidade relativa de 34% (ROCHA et al., 2011).

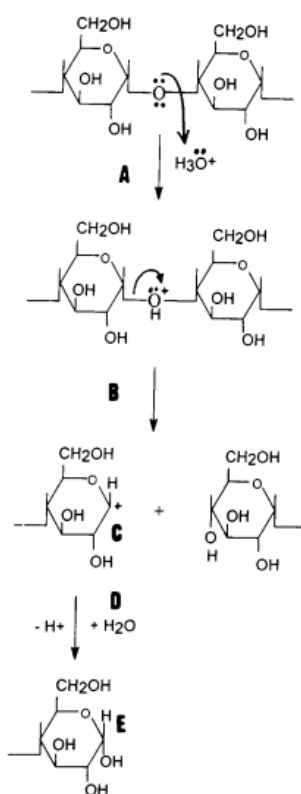
O amido de batata tem como característica grânulos grandes com diâmetro que varia de 10 a 100  $\mu\text{m}$  com formatos arredondados ou ovais e superfícies lisas (YOO et al., 2009). Esse amido apresenta padrão de raios-X tipo B, teor de amilose variando de 14 a 38%, dependendo da espécie, condições climáticas e de cultivo. McPherson e Jane (1999) atribuem o alto teor de amilose aparente encontrado para o amido de batata ao alto conteúdo de cadeias ramificadas muito longas na amilopectina deste amido que podem se complexar com o iodo e também superestimar o teor de amilose. Após subtrair a afinidade por iodo da amilopectina, estes autores observaram que o teor de amilose do amido de batata que era de 37,8% caiu para 18,3%.

## 1.3. Hidrólise ácida

O amido pode ser modificado química, física e enzimaticamente. Como um método de modificação química, a hidrólise ácida envolve a quebra das ligações

glicosídicas dos amidos nativos pelo ácido. Industrialmente, a modificação ácida do amido pode ser realizada com HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com temperatura variando de 25 a 55 °C por vários períodos de tempo (HOOVER, 2000).

A hidrólise envolve principalmente a quebra das moléculas do amido em fragmentos de menor massa molecular. Na hidrólise ácida, os íons hidroxônios (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) promovem um ataque eletrofílico no átomo de oxigênio da ligação glicosídica  $\alpha$ -(1→4) (Figura 5A). Os elétrons de uma das ligações carbono-oxigênio passam para o átomo de oxigênio (Figura 5B), gerando um carbocation intermediário instável e com alta energia (Figura 5C). O carbocation intermediário é um ácido de Lewis, que irá reagir com a água (Figura 5D), uma base de Lewis, levando à formação de um grupo hidroxila (Figura 5E) (HOOVER, 2000).



**Figura 5** – Mecanismo da hidrólise ácida no amido (HOOVER, 2000).

A hidrólise ácida do amido é caracterizada por dois estágios, o primeiro estágio da hidrólise refere-se à degradação da região amorfa, devido à menor organização das moléculas nessa área, enquanto que um segundo estágio seria caracterizado por uma

lenta hidrólise na região cristalina desses grânulos (ROBIN et al., 1974; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; FRANCO; CABRAL; TAVARES, 2002; SRICHUNWONG et al., 2005; CHUNG; LAI, 2006; CAMPANHA; FRANCO, 2011; KIM et al., 2012). Li, Corke e Berta (2007) propuseram, ainda, três etapas durante a hidrólise ácida, uma rápida que corresponde à degradação da região amorfa, e outras duas lenta e muito lenta que corresponderiam à degradação das regiões cristalinas do grânulo. Robin et al. (1974) descreveram que a hidrólise muito lenta da região cristalina ocorre devido à progressiva erosão da superfície externa dos cristalitos.

A hidrólise ácida provoca redução expressiva no teor de amilose do amido (FRANCO; CABRAL; TAVARES, 2002; CAMPANHA, 2010; UTRILLA-COELLO et al., 2014). Utrilla-Coello et al. (2014) ao estudarem a cinética da hidrólise ácida do amido de milho verificaram que o ácido degrada principalmente as moléculas de amilose e as longas cadeias da amilopectina, sendo que com 3 dias de hidrólise quase toda a amilose tinha sido degradada enquanto a amilopectina foi mais resistente à hidrólise, principalmente por estar nas regiões semicristalinas. Já Amaya-Llano et al. (2011) observaram que o teor de amilose aparente aumentou nos amidos de milho e raízes de Jicama hidrolisados com ácido clorídrico. Este aumento foi atribuído à ação do ácido sobre as regiões amorfas da amilopectina que resultou na liberação de longos fragmentos lineares capazes de formar complexos com o iodo superestimando o teor de amilose aparente.

A distribuição do comprimento de cadeia da amilopectina, também é influenciada pela extensa hidrólise ácida do amido. Estudos da estrutura granular do amido por meio da hidrólise ácida (*Lintner*, dextrinas Nægeli e nanocristais) mostraram que após a hidrólise, duas principais populações das cadeias de amilopectina são observadas com GP de 13-15 e 21-27. O GP 13-15 é a fração linear e o GP 21-27 é a fração uniramificada, dados que foram confirmados após a desramificação com a enzima isoamilase (ROBIN et al., 1974; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; MCPHERSON; JANE, 1999; GERÁRD et al., 2002; FRANCO; CABRAL; TAVARES, 2002; BERTOFT, 2004; MIAO et al., 2011; KIM et al., 2012). Robin et al. (1974) descreveram que os cristalitos de amido consistem de cadeias com empacotamento fechado com cerca de 15 unidades de glicose, ou seja, cadeias

compactas com GP 15 que apresentam dimensões de 60 Å, essas cadeias seriam originárias das cadeias ramificadas. Uma redução na proporção de cadeias com GP 6 também foi observada nos amidos hidrolisados, sugerindo que as cadeias curtas são rapidamente degradadas pelo ácido junto com o material amorfo, já que estas cadeias não são longas o suficiente para formar duplas hélices estáveis (SRICHUNWONG et al., 2005) ou, ainda, devido à hidrólise parcial das cadeias ramificadas sobre a superfície de cristais e a presença de defeito nas estruturas cristalinas (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; PALMA-RODRIGUEZ et al., 2012). Esses fatos indicam que as características das lamelas amorfas são um fator crítico para a suscetibilidade à hidrólise ácida dos amidos. No entanto, a distribuição do comprimento das cadeias laterais de amilopectina também afeta, de certo modo, a degradação dos grânulos (SRICHUNWONG et al., 2005).

Campanha (2010) avaliou as características estruturais de amidos de batata, batata-doce, mandioca e mandiocinha-salsa a partir de suas dextrinas Näegeli e observou que as cadeias curtas da amilopectina desses amidos são mais externas e, portanto, mais suscetíveis ao ataque ácido, enquanto as cadeias longas foram protegidas durante o tratamento. Ao comparar as dextrinas desses amidos antes e após a desramificação com isoamilase, o autor verificou que as cadeias mais longas da amilopectina eram compostas de cadeias uniramificadas cuja ligação  $\alpha$ -(1,6) nos amidos com padrão cristalino tipo A estava na lamela cristalina e ficou protegida durante a hidrólise ao contrário dos amidos com padrão tipo B em que a ligação  $\alpha$ -(1,6) se encontrava nas áreas amorfas que são mais suscetíveis à hidrólise ácida. A razão entre as áreas relativas das cadeias uniramificadas e das cadeias lineares indicaram que as dextrinas do amido de mandioca possuíam mais cadeias ramificadas, enquanto as dextrinas do amido de batata tinham mais cadeias lineares.

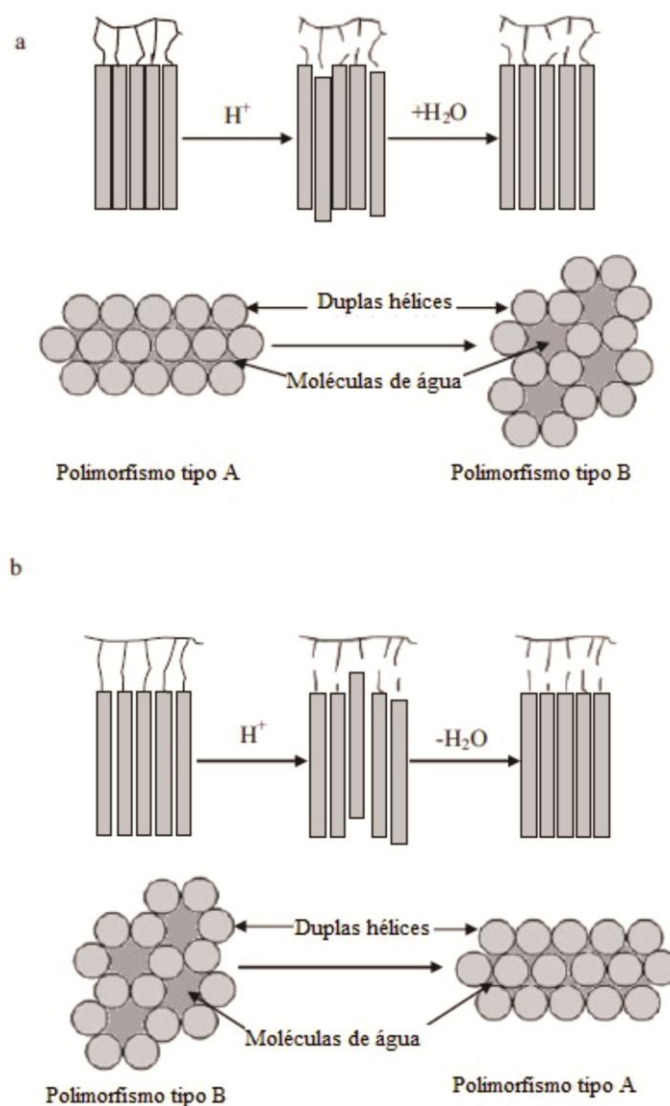
Miao et al. (2011) estudaram o impacto da hidrólise ácida suave sobre a estrutura e propriedades de digestão do amido de milho ceroso e verificaram que o ácido provocou a quebra das cadeias mais curtas A e das cadeias longas B, sendo que estas cadeias são componentes estruturais das regiões amorfas e cristalinas e a quebra das cadeias resultou em uma estrutura mais organizada. Os resíduos obtidos da hidrólise ácida do amido resultaram na degradação das regiões amorfas do amido e com isso

ocorreu uma diminuição da capacidade da amilase degradar regiões cristalinas, levando assim a uma menor quantidade de amido lentamente digerível e maior teor de amido resistente.

Palma-Rodriguez et al. (2012) avaliaram o efeito da hidrólise ácida na características estruturais e físico-químicas de amidos de batata, arroz e milho e observaram que houve uma redução das cadeias longas ( $GP > 37$ ) em consequência da hidrólise ácida da região amorfa dos amido, porém essa redução foi mais expressiva em amidos de cereais do que no amido de batata, indicando que as características morfológicas dos amidos influenciam a hidrólise.

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanho acoplada a espalhamento de luz laser com multiângulos foi utilizada por Ulbrich, Natan e Flöter (2014) para avaliarem o efeito da hidrólise ácida, em condições menos drásticas, em amidos de trigo, batata e ervilha durante 4 e 24 horas. Esses autores observaram pequenas diferenças no tempo de eluição e na massa molecular dos amidos hidrolisados por 4 horas em relação aos amidos nativos indicando pequenas mudanças na sua estrutura. Os amidos hidrolisados por 24 horas apresentaram redução expressiva da massa molecular e mudanças distintas no perfil das curvas de cromatografia, quando comparado com os amidos nativos e os amidos hidrolisados por 4 horas, devido à degradação da amilose e a despolimerização das cadeias da amilopectina que resultou em um aumento da liberação das cadeias curtas da amilopectina.

A alteração da estrutura granular do amido durante a hidrólise ácida acarreta em um aumento da cristalinidade relativa à medida que aumenta o tempo da reação. Essas alterações são visíveis nos difractogramas de raios-X, pois os picos centrados nas regiões de  $15-30^\circ 2\theta$  aumentam sua intensidade e conseqüentemente aumenta sua cristalinidade. A hidrólise também pode alterar o padrão cristalino de raios-X dos amidos de B para A, de A para B, de C para A ou de C para B. As mudanças do padrão cristalino de B para A ou de A para B ocorre, pois o rearranjo das duplas hélices envolve a translação lateral ou axial dessas ligações, que leva ao enchimento dos canais de água nas cavidades dos cristalitos com mais moléculas de água ou duplas hélices, como observado na Figura 6 (WNAG; COLPELAND, 2015).



**Figura 6** – Mecanismo de transição polimórfica durante a hidrólise ácida (a) Polimorfismo de A para B e (b) polimorfismo de B para A proposto por Wang e Copeland (2015).

As mudanças do padrão cristalino de C para A ou C para B é mais comumente encontrada e está relacionada com a hidrólise preferencial de um polimorfo seguido de possível rearranjo das duplas hélices dissociadas (WANG; COLPELAND, 2015). Wang, Yu e Yu (2008) avaliaram as características estruturais dos amidos de ervilha (padrão C) utilizando hidrólise ácida e observaram que o padrão tipo C apresenta em sua estrutura regiões amorfas localizadas na parte central e regiões cristalinas na periferia dos grânulos. Durante a hidrólise ácida, esses autores observaram o



desaparecimento das características do padrão tipo B e mudança do padrão tipo C para o tipo A. Hernández-Jaimes et al. (2013) observaram o mesmo comportamento na hidrólise ácida do amido de banana (padrão tipo C) e verificaram que houve uma redução da intensidade do pico  $5,4^\circ$  em  $2\theta$  nos primeiros dias de hidrólise, indicando que a estrutura cristalina tipo A era predominante neste amido.

#### 1.4. Nanotecnologia

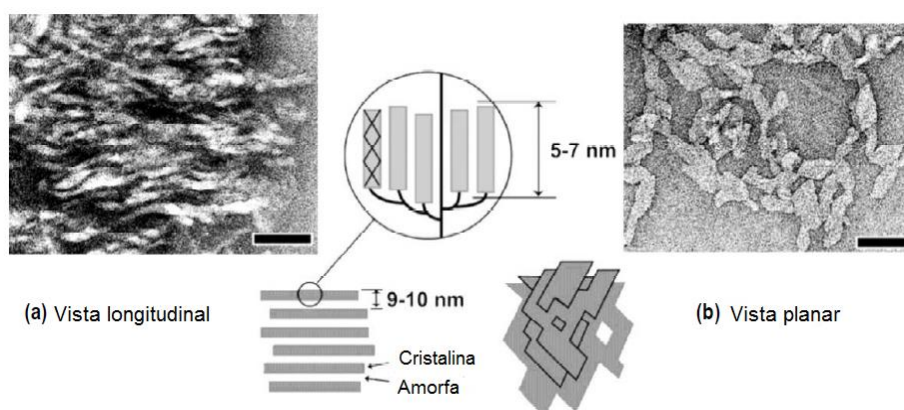
A nanotecnologia compreende a ciência e tecnologia relacionada ao controle e manipulação da matéria em uma escala menor que 100 nm em dimensão, portanto, partículas com tamanhos inferiores a 100 nm são denominadas de nanopartículas (SUBRAMANI; AHMED, 2011), as quais possuem propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (CHAU; WU; YEN, 2007). Tais nanopartículas apresentam grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas distintas daquelas partículas e superfícies macroscópicas (QUINA, 2004).

A nanocronstrução das estruturas das partículas pode ser obtida pelo método *Bottom-up* (de baixo para cima) em que manipula átomos através do comportamento intramolecular das moléculas para formar nanoestruturas como nanotubos, enquanto o método *top-down* (de cima para baixo) refere à construção de nanopartículas a partir de partículas maiores. O método *top-down* é normalmente utilizado em sistemas a seco e o *Bottom-up* é utilizado em sistemas em meio aquoso ou com solvente orgânico (DURAN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

#### 1.5. Nanocristais

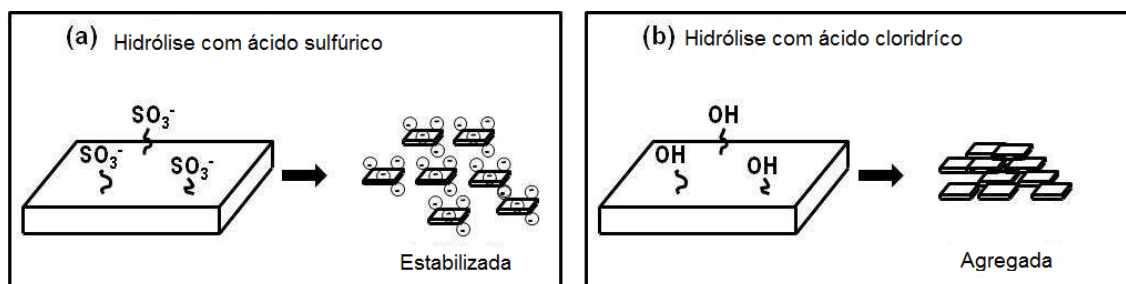
Nanocristais podem ser obtidos de diferentes polissacarídeos como amido, celulose e quitina por meio de hidrólise ácida. As formas dos nanocristais dependem da fonte do polissacarídeo: rígidas e tubulares, para celulose e quitina, e em forma de plaquetas, para amido (THIELEMANS; BELGACEM; DUFRESNE, 2006). As estruturas semicristalinas dos amidos permitem a obtenção de nanocristais com formato

de plaqueta, pois a hidrólise ácida, em temperatura menor que a temperatura de gelatinização do amido, provoca a quebra das ligações glicosídicas, com isso ocorre a degradação da região amorfa e liberação da região cristalina. Estas plaquetas são, na verdade, nanoplaquetas cristalinas que apresentam cerca de 5-7 nm de espessura, 20-40 nm de comprimento e 15-30 nm de largura, variando com a fonte botânica. Essas características geométricas dos nanocristais são correlacionadas com a célula monocíclica do polimorfismo tipo A encontrado nos amidos (PUTAUX et al., 2003). A Figura 7 mostra a primeira imagem de nanocristais obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).



**Figura 7** – Primeira observação de nanocristais em MET. a) vista longitudinal b) vista planar. (PUTAUX et al., 2003).

Angellier et al. (2004) utilizaram superfície de resposta para otimizar o método de hidrólise ácida usando ácido sulfúrico e amido de milho ceroso para obtenção de nanocristais, uma vez que o método comumente aplicado para esta finalidade usava o ácido clorídrico durante 40 dias. Esses autores observaram que 5 dias de hidrólise utilizando 3,16 M de ácido sulfúrico a 40 °C mostrou um rendimento de 14,69 % de nanocristais de amido de milho ceroso, praticamente o mesmo rendimento obtido quando HCl 2,2N a 36 °C era usado por 40 dias (15,7 %). Os autores concluíram que o uso do ácido sulfúrico é mais vantajoso por otimizar o tempo de preparo e produzir cristais mais estáveis e com menor tamanho, enquanto aqueles obtidos com HCl eram mais agregados (Figura 8).



**Figura 8** – Nanocristais obtidos por diferentes métodos de hidrólise a) hidrólise com ácido sulfúrico b) hidrólise com ácido clorídrico (LECORRE, 2011).

LeCorre, Bras e Dufresne (2012) ao avaliarem as propriedades térmicas dos nanocristais obtidos de amidos com diferentes teores de amilose observaram que a proporção de amilose e amilopectina pouco influencia nas características dos nanocristais e verificaram que os nanocristais obtidos de amidos com padrão tipo B apresentavam estruturas cristalinas mais estáveis do que os nanocristais obtidos do amido tipo A.

Kim et al. (2012) estudaram nanocristais de amidos com diferentes teores de amilose e verificaram que, independente da fonte botânica, os nanocristais apresentaram formatos ovais ou arredondados, ao contrário de Putaux et al. (2003) que observaram formato de plaqueta nos nanocristais de amido. Kim et al. (2012) também observaram que o tamanho das partículas variou com a fonte botânica do amido. Assim, o amido de batata (padrão tipo B) e os amidos de milho normal e ceroso (padrão tipo A) apresentaram nanopartículas de menor diâmetro que aquelas obtidas do amido com alto teor de amilose (padrão tipo B) e amido de feijão Mungo (padrão tipo C). As nanopartículas isoladas a partir da hidrólise ácida do amido podem corresponder aos bloquetes existentes nos grânulos onde as lamelas da amilopectina são organizadas dentro da estrutura cristalina. Jivan, Mandadlou e Yarmand (2013) caracterizaram os nanocristais de amido de batata obtidos pela hidrólise com ácido clorídrico seguida de ligação cruzada com hexametáfosfato de sódio. Esses autores verificaram que a ligação cruzada fortaleceu a estrutura cristalina dos nanocristais, o que provocou aumento nas temperaturas de fusão. As topografias obtidas da Microscopia de Força Atômica sugeriram que os nanocristais de amido foram originados dos bloquetes menores de

amilopectina. Wei et al. (2014) compararam a estrutura dos nanocristais de amido de milho ceroso hidrolisados com HCl 2,2 N ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,16 M por sete dias e observaram que a baixa concentração de HCl resultou em cristais heterogêneos com maior tendência a agregação, ao contrário dos cristais obtidos pela hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que se mostraram mais estáveis, com partículas mais homogêneas como detectado nas análises de potencial zeta.

O estudo da estrutura molecular dos nanocristais permite distinguir as cadeias internas e externas e sua organização nas regiões cristalinas. A desramificação dos nanocristais permite determinar o comprimento das cadeias ramificadas. A isoamilase cliva rapidamente as ligações  $\alpha$ -(1-6) nas cadeias longas, enquanto a pululanase consegue quebrar as pequenas cadeias ramificadas com maior eficiência (ROBYT, 2009; TESTER; QI, 2011). Porém, essas enzimas não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação quando o mesmo está ligado a um único resíduo de glicose e atuam muito lentamente no resíduo maltosil (ROBYT, 2009; TESTER; QI, 2011). As cadeias externas podem ser removidas utilizando exo-enzimas como  $\beta$ -amilase. A  $\beta$ -amilase quebra as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) sequencialmente, de duas em duas, a partir da extremidade não-redutora da molécula. A ação da enzima cessa quando ela se aproxima de um ponto de ramificação (ligação glicosídica  $\alpha$ -1,6) ou de alguma mudança estrutural da molécula (ROBYT, 2009; TESTER; QI, 2011). Os produtos da reação são maltose (GP 2), maltotriose (GP 3) e  $\beta$ -dextrinas limite ( $\beta$ -DL). As cadeias internas podem ser determinadas desramificando (isoamilase e pululanase) essas estruturas ramificadas ( $\beta$ -DL).

Angellier-Coussy et al. (2009) estudaram a estrutura molecular dos nanocristais de amidos de milho ceroso (padrão tipo A) e observaram que os mesmos correspondiam às lamelas cristalinas dos grânulos nativos. Esses nanocristais foram descritos como blocos de paralelepípedos com comprimento de 20-40 nm e uma largura de 15-30 nm. Esses autores observaram que, dependendo da posição das ramificações na estrutura cristalina, os componentes moleculares dos nanocristais eram formados por duas populações de dextrinas, identificadas como A e B com alto e baixo grau de polimerização, respectivamente. Essas dextrinas se mostraram resistentes à  $\beta$ -amilase e enzimas desramificantes (isoamilase e pululanase). Devido às ramificações das

dextrinas e ao comprimento das plaquetas, os autores sugeriram que a maioria dos pontos de ramificação se encontrava na superfície redutora dos nanocristais, enquanto o restante estaria localizado no lado não redutor.

Por outro lado Bertoft (2004), Wikman, Blenow e Bertoft (2013), Wikman et al. (2013) e Goldstein et al. (2016) estudaram a influência do tempo/temperatura de hidrólise e a interferência da amilose na estrutura molecular de resíduos lintnerizados (amidos hidrolisados com HCl) ou de amilodextrinas Näegeli (amidos hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e observaram que o teor de amilose tem um efeito significativo na estrutura molecular dos resíduos cristalinos, pois a mesma retarda as taxas de hidrólise e reduz a quantidade de duplas hélices na estrutura cristalina.

Os nanocristais de amido estão sendo cada vez mais estudados devido a sua ampla aplicação nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, porém sua aplicação industrial ainda é limitada devido ao baixo rendimento. A obtenção dos nanocristais também é importante para obter mais informações sobre o comportamento da estrutura molecular do amido durante a hidrólise.

#### 1.5.1. Aplicação dos nanocristais

Nos últimos anos, a poluição do meio ambiente aumentou em decorrência da utilização de polímeros sintéticos, particularmente na utilização de embalagens e impressão *off-set* de sacos de plástico e copos (PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013). O uso de plásticos pela sociedade contemporânea está cada vez mais acentuado acarretando sérios problemas ambientais (PÓVOA NETO et al., 2011).

Segundo a Associação Brasileira de Embalagens (ABRE, 2014) os materiais plásticos representam a maior participação (39%) no mercado da produção de embalagens de forma geral, enquanto os materiais celulósicos como papelão ondulado, cartolina, papel cartão e papel representam a segunda maior participação, destacando com isso o crescente uso de embalagens plásticas pelas indústrias, principalmente de alimentos. O grande impacto ambiental que os materiais plásticos descartados provocam tem contribuído para o desenvolvimento de materiais que se degradem mais

rapidamente no ambiente, levando a uma completa mineralização ou bio-assimilação desses materiais (PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013).

O amido é considerado um material mais promissor para embalagem por ser de baixo custo e totalmente biodegradável. A maneira usual para processar filmes de amido consiste em convertê-lo em um polímero termoplástico por meio da mistura do polímero com água ou agente plastificante não aquoso, geralmente polióis, como glicerol e sorbitol (LABET; THIELEMANS; DUSFRENE, 2007).

### **1.6. Biofilmes a base de amido**

Materiais finos e flexíveis obtidos de biopolímeros são chamados de biofilmes, que podem ou não ser filmes comestíveis e atuar como cobertura nos alimentos (SOBRAL, 2000). A biodegradação é um processo natural e complexo pelo qual compostos orgânicos do meio ambiente são convertidos em compostos mais simples, mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares como o do carbono, nitrogênio e enxofre. Esta pode ocorrer somente dentro da biosfera onde os micro-organismos têm um papel principal no processo (SALAME, 1986). Em síntese, a biodegradação de um polímero é o processo intrínseco pelo qual micro-organismos e suas enzimas consomem este polímero como fonte de nutrientes, em condições normais de umidade, temperatura e pressão; os polímeros melhor adaptados à biodegradação completa são os naturais, aqueles hidrolisáveis a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , ou a  $\text{CH}_4$  e os polímeros sintéticos que possuam estruturas próximas àquelas dos naturais (LIMA, 2004; BARDI; ROSA, 2007; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Os polímeros naturais biodegradáveis geralmente são produzidos na natureza por todos os organismos vivos, sem interferência humana, como os polissacarídeos, celulose, amido e proteínas. A utilização desses materiais em embalagens para alimentos depende, além de parâmetros como custo e disponibilidade, das suas propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), ópticas (cor e opacidade), de barreira (permeabilidade ao vapor d' água e ao  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), solubilidade em água e sensoriais. Essas propriedades estão relacionadas com o biopolímero usado (conformação, peso molecular, distribuição de cargas e polaridade), condições do

processo (pH, tratamento térmico da solução e tipo de plastificante) e condições ambientais (umidade relativa e temperatura), importantes por causa da natureza higroscópica dos biopolímeros e dos plastificantes usados (SOBRAL, 2000).

O amido tem potencial para ser utilizado como polímero termoplástico biodegradável. Na verdade este polímero não é verdadeiramente termoplástico, mas pode ser convertido em uma fase polimérica contínua misturando o amido com água ou plastificante não aquoso (geralmente polióis, tais como glicerol e sorbitol) (LABET; THIELEMANS; DUSFRENE, 2007; GARCÍA et al., 2011). A preponderância da amilose em amidos resulta em filmes mais fortes, pois a estrutura ramificada da amilopectina geralmente resulta em filmes com propriedades mecânicas menos adequadas, tais como menor tensão de tração (THARANATHAN, 2003; PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013).

Os biofilmes a base de amido podem ser obtidos pela técnica de *casting* ou por extrusão. Na técnica de *casting* o biofilme é formado pela mistura do amido com água ou agente plastificante não aquoso, a qual é espalhada sobre um suporte e seca para evaporação do solvente. Essa técnica é a mais utilizada e discutida na pesquisa de biofilmes de amido e apresenta bons resultados no âmbito laboratorial. Os biofilmes também podem ser obtidos por extrusão com mono ou dupla rosca, sob temperatura média de 120 °C, com a vantagem de ser um processo mais rápido, ter menor custo em escala industrial e já ser empregado para produção de embalagens sintéticas (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

#### 1.6.1. Propriedades de barreira

A utilização de embalagens na conservação dos alimentos visa limitar as transferências ou trocas entre o meio ambiente e o alimento. A escolha de uma embalagem adequada depende das propriedades de barreira que a mesma pode oferecer como permeabilidade ao vapor d' água, aos gases e aos solutos. O principal mecanismo para o fluxo de gases e vapor do filme é a difusão molecular que ocorre na abertura dos espaços vazios entre os segmentos das cadeias dos polímeros (MALI et al., 2002).

A permeabilidade ao vapor d' água é definida como a taxa de transmissão de vapor de água através da unidade de área do material plano a uma determinada espessura, induzida pela diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas sob condições definidas de temperatura como estabelecida pela Norma ASTM E96-95 (ASTM, 1995).

O tipo de plastificante utilizado na formação do biofilme a base de amido influencia a permeabilidade ao vapor d' água. Mali et al. (2002) caracterizaram a microestrutura e determinaram a permeabilidade ao vapor d' água e as isotermas de sorção de água dos filmes de amido de inhame com diferentes concentrações de glicerol. Esses autores observaram que devido ao caráter hidrofílico do glicerol, os filmes mostraram caráter higroscópico.

#### 1.6.2. Propriedades mecânicas

Biofilmes plásticos empregados em embalagens para alimentos devem ser resistentes à abrasão e à ruptura para poderem reforçar a estrutura e facilitar o manejo dos alimentos. Essas embalagens devem ser flexíveis para que possam se adaptar às deformações sem comprometer o alimento. As propriedades mecânicas dos biofilmes são dependentes do processo de formação (macromolécula, solvente, plastificante, ajustador de pH), do processo de obtenção (técnica de *casting* ou por extrusão) e do modo de aplicação. As propriedades mecânicas dos biofilmes são influenciadas pela temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) (MALLI, et al., 2002).

Os biofilmes podem apresentar característica vítrea ou emborrachada. As propriedades mecânicas de materiais amorfos são modificadas em temperaturas acima da  $T_g$ , pois as cadeias das macromoléculas têm sua mobilidade aumentada e, neste ponto, as propriedades físicas e mecânicas sofrem uma forte mudança de comportamento. Temperaturas abaixo da  $T_g$  tornam o material mais rígido e temperaturas acima da  $T_g$  tornam o material mais viscoelástico (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996).



### 1.6.3. Aplicação de nanocristais de amido em biofilmes

Os biofilmes obtidos de amido apresentam algumas restrições, pois devido ao caráter hidrofílico, estes filmes possuem altas propriedades de barreira a vapores de água e baixa permeabilidade a gases como CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. As propriedades mecânicas também são um fator limitante, tendo em vista que, quando comparadas a de filmes sintéticos, as mesmas possuem flexibilidade limitada, pois o amido gelatinizado apresenta fortes ligações polares que tornam os biofilmes quebradiços (HULLEMAN et al., 1999). Outra desvantagem é que a natureza hidrófila dos amidos termoplásticos torna esses filmes suscetíveis à umidade, modificando sua estabilidade dimensional e propriedades mecânicas (GARCÍA et al., 2011).

Neste contexto, o uso de nanocristais pode ajudar a melhorar essas características. A forma de plaquetas dos nanocristais de amido poderia melhorar as propriedades de barreira do material, além de os mesmos poderem ser aplicados em embalagens flexíveis de alimentos (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010). Os nanocristais de amido, quitina e celulose, quando aplicados à matriz de polímeros sintéticos ou biopolímeros, melhoraram sua resistência mecânica e permeabilidade ao vapor (KRISTO; BILIADERIS, 2007).

Kristo e Biliaderis (2007) verificaram que a adição de nanocristais de amido de milho ceroso a uma matriz polimérica composta por pululano melhorou a resistência mecânica do biofilme, porém diminuiu seu alongamento. O aumento da concentração de nanocristais diminuiu a permeabilidade ao vapor dos filmes de pulano. García et al. (2011) avaliaram o efeito da adição de nanocristais de amido de milho ceroso sobre biofilmes produzidos a partir do amido do milho ceroso com e sem agente plastificante. Esses autores observaram que o processamento do biofilme não alterou a cristalinidade do nanocristais e que o módulo de Young e a permeabilidade ao vapor diminuíram quando a matriz plastificada era adicionada de nanocristais

Zou et al. (2011) estudaram o efeito da adição de nanocristais de amido de ervilha em biofilmes de poliuretano a base de água e observaram que a adição de até 30% de nanocristais provocou uma boa dispersão no poliuretano à base de água. Os biofilmes produzidos com a adição de nanocristais apresentaram melhoria da força e do

módulo de Young. A força máxima de tração foi obtida com 10% de nanocristais e o módulo de Young aumentou em 35,7 vezes. Acima dessa concentração, a força de tração dos biofilmes diminuiu devido à agregação dos nanocristais.

Os estudos da aplicação de nanocristais de amido em biofilmes ainda são incipientes, já que muitos são os fatores que influenciam as suas propriedades, tais como o tipo de amido utilizado, o tipo de agente plastificante (sorbitol ou glicerol, entre outros), a concentração adequada de nanocristais e o processamento.

Piyada, Waranyou e Thawien (2013) estudaram o efeito da adição de nanocristais de arroz (5 a 30%), em dispersão de amido de arroz com sorbitol, sobre as propriedades mecânicas, térmicas e estruturais de biofilmes de amido de arroz e verificaram que os biofilmes de arroz adicionados de 20% de nanocristais apresentaram propriedades mecânicas mais adequadas, com elevada resistência à tração e alongamento na ruptura. As propriedades de barreira à água e a estabilidade térmica dos biofilmes aumentaram com o aumento da concentração de nanocristais. Já Li et al. (2015) estudaram o efeito da adição de 1, 3, 5, 7 e 9% de nanocristais de amido de milho ceroso em filmes à base de amido de ervilha com 40% de amilose com glicerol. Esses autores observaram que a adição de 5% de nanocristais melhorou as propriedades mecânicas dos filmes, aumentando a resistência à tração e módulo elástico e diminuindo o alongamento da ruptura e as propriedades de barreira à água. A utilização de concentrações maiores que 5% provocou o aparecimento de nanofios que faz com que os filmes fiquem com uma estrutura rugosa e melhore as propriedades de barreira por interagir com a amilose, porém as propriedades mecânicas pioraram.

Os estudos da aplicação de nanocristais de amido em biofilmes demonstraram que o teor de amilose é um dos fatores que mais influenciam a escolha do amido para a dispersão do amido em plastificante, pois a amilose interage mais com os nanocristais o que melhora as propriedades de barreira. Mas ainda é incerto o melhor tipo de agente plastificante (sorbitol ou glicerol, entre outros), a concentração adequada de nanocristais e o processamento.

## 2. REFERÊNCIAS

ABRE. Associação Brasileira de Embalagens. **Estudo macroeconômico da embalagem ABRE / FGV**, 2014. Disponível em: <http://www.abre.org.br/setor/dados-de-mercado/> Acesso em: 28 jan 2017.

AMAYA-LLANO, S. L.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; ALEGRÍA, A. L. M.; ZAZUETA-MORALE, Z. L. Comparative studies on some physico-chemical, thermal, morphological, and pasting properties of acid-thinned Jicama and maize starches. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p.48–60, 2011.

ANGELLIER, H.; CHOISNARD, L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; PATRICK, O.; DUFRESNE, A. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy Maize starch nanocrystals using a response surface methodology. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1545–1551, 2004.

ANGELLIER-COUSSY, H.; PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S. N.; DUFRESNE, A.; BERTOFT, E.; PEREZ, S. The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1558–1566, 2009.

ASTM – American Society for Testing and Material. Philadelphia (USA):ASTM, 1995.

ATWEEL, W. A. The terminology and methodology associate with basic starch phenomena. **Cereal foods World**, v. 33, p. 306–311, 1988.

BALL, S.; GUAN, H-P.; JAMES, M.; MYERS, A.; KEELING, P.; MOUILLE, G.; BULÉON, A.; COLONNAS, P.; PREISS, J. From Glycogen to amilopectin: A model for biogenesis of the plant starch granule. **Cell**, v.86, p. 349–352, 1996.

BARDI, M. A. G.; ROSA, D. S. Avaliação da biodegradação em solo simulado de poli ( $\beta$ -caprolactona), acetato de celulose e suas blendas. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 43–47, 2007.

BERGTHALLER, W.; HOLLMANN, J.; JOHANNIS, P. K. Starch. In **Comprehensive Glycoscience**, Elsevier: Oxford, 2007. p. 579–612.

BERTOFT, E. Lintnerization of two amylose-free starches of A- and B-crystalline types, respectively. **Starch/Stärke**, v. 56, p. 167–180, 2004.

BLANSHARD, J. M. V. Starch granule structure and function: a physicochemical approach. In: **Starch: Properties and Potentials**, Galliard, T., Ed. Society of Chemical Industry: London, U.K., 1987; Vol. 13, p. 16–54.

BLENNOW, A.; BAY-SMIDT, A. M.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. L. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.211–218, 2000.

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

CAMPANHA, R. B. **Características físico-químicas e estruturais de amidos nativos e suas dextrinas Naegeli**. 79f. (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

CAMPANHA, R. B.; FRANCO, C. L. M. Gelatinization properties of native starches and their Naëgeli dextrins. **Journal Thermal Analyses Calorimeter**, v. 106, n. 3, 799–804, 2011.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 269–280, 2007.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 277–284, 1998.

CHUNG, Y. –L.; LAI, H. –H. Molecular and granular characteristics of corn starch modified by HCl-methanol at different temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 527–534, 2006.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527–1534, 2009.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DURAN, N.; MATTOSO, C. L. H.; MORAIS, P. C. In:\_\_. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1. ed. São Paulo. ARTLIBER. 2006.

ELIASSON, A. C. **Starch in food – Structure, function and applications**. New York: Boca Raton, CRC, 2004. 605p.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas: Propriedades Gerais do Amido**. v. 1 Campinas: Fundação Cargill, 2001. 224p.

FRANCO, C. M. L.; CABRAL, R. A. F.; TAVARES, D. Q. Structural and physicochemical characteristics of lintnerized native and sour cassava starches. **Starch/Stärke**, v. 54, p. 469–475, 2002.

FRENCH, D. Chemical and physical of starch. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 1048–1061, 1973.

GARCÍA, N. L.; RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREND, M.; GOYANESA, S. Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 203–210, 2011.

GÉRARD, C.; COLONNA, P.; BULÉON, A.; PLANCHOT, V. Order in maize mutant starches revealed by mild acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 131–141, 2002.

GOLDSTEIN, A.; ANNOR, G.; PUTAUX, J.-L.; HEBELSTRUP, K. H.; BLENNOW, A.; BERTOFT, E. Impact of full range of amylose contents on the architecture of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 305–318, 2016.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L.G.M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie**, v. 29, p. 10–17, 1996.

HANASHIRO, I.; ABE, J.-I.; HIZUKURI, S. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 283, n. 22, p.151–159, 1996.

HERNÁNDEZ-JAIMES, C.; BELLO-PÉREZ, L. A.; VERNON-CARTER, E. J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Plantain starch granules morphology, crystallinity, structure transition, and size evolution upon acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 207–213, 2013.

HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 342–347, 1986.

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

HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food Reviews International**, v. 16, n. 3, p. 369–392, 2000.

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

HULLEMAN, S. H. D.; KALISVAART, M. G.; JANSSEN, F. H. P.; FEIL, H.; Vliegenthart, J. F. G. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticised, compression moulded potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 351–360, 1999.

IMBERTY, A., BULÉON, A., TRAN, V., PEREZ, S. Recent advances in knowledge of starch structure. **Stärke/Starch**, v. 43, p. 375–384, 1991.

JANE, J. L.; SHEN, J. J. Internal structure of the potato starch granule revealed by chemical gelatinization. **Carbohydrate Research**, v. 247, p.279–290, 19993.

JANE, J. L.; WONG, K. S.; MCPHERSON, A. E. Branch-structure difference in starches of A- and B-type Xray patterns revealed by their Naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 300, p. 219–227, 1997.

JANE, J. Structure of starch granules. **Journal Applied Glycoscience**, v. 54, p. 31–36, 2007.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205–213, 2006.

JIVAN, M. J.; MADADLOU, A.; YARMAND, M. An attempt to cast light into starch nanocrystals preparation and cross-linking. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1661–1666, 2013.

KASEMSUWAN, T.; JANE, J., Location of amylose in normal starch granules. II. Locations of phosphodiesterase cross-linking revealed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Cereal Chemistry**, v. 71, p. 282–287, 1994.

KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives and starch phospholipids by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.73, n.6, p. 702–707, 1996.

KIM, K.; LEE, J. H.; KIM, J. Y.; LIM, W. J.; LIM, S. T. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch/Stärke**, v.64, p. 367–373, 2012.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 146–158, 2007.

LABET, M.; THIELEMANS, W.; DUFRESNE, A. Polymer grafting onto starch nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2916–2927, 2007.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. **Carboidratos em alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648p.

LECORRE, D. **Starch nanocrystals: Preparation and Application to bio-based flexible packaging**. 450f. 2011. (Tese de doutorado) – Doutorado em Engenharia: materiais, mecânicas, energetic, ambientais e processo de produção. Paris, 2011.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: a review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139–1153, 2010.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of starch's properties on starch nanocrystal thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 658–666, 2012.

LI, W.; CORKE, H.; BETA, T. Kinetics of hydrolysis and changes in amylase content during preparation of microcrystalline starch from high-amylose maize starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 398–405, 2007.

LI, X.; QIU, C.; JI, N.; SUN, C.; XIONG, L.; SUN, Q. Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 155–162, 2015.

LIM, S.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Characterization of phosphorus in starch by <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.71, p. 488–493, 1994.

LIMA, S. L. T. Reciclagem e biodegradação de plásticos. **Revista Científica do IMAPES**, Sorocaba, v. 2, n. 2, p. 28–34, 2004.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, n. 50, p. 379–386, 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Review: Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010.

MCPHERSON, A. E.; JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 1, p. 57–70, 1999.

MIAO, M.; JIANG, B.; ZHANG, T.; JIN, Z.; MU, Z. Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. **Food Chemistry**, v. 126, p. 506–513, 2011.

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

OLIVEIRA, L. L.; LACERDA, C. de S.; ALVES, I. J. B. da R.; SANTOS, E. D.; OLIVEIRA, S. de A.; BATISTA, T. S. de A. Impactos ambientais causados pelas sacolas plásticas: o caso campina grande - PB. **BioFar: Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 1, 2012.

PALMA-RODRIGUEZ, H. M.; AGAMA-ACEVEDO, E.; MENDEZ-MONTEALVO, G.; GONZALEZ-SOTO, R. A.; VERNON-CARTER, E. J.; BELLO-PÉREZ, L. A. Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. **Starch/Stärke**, v. 64, p. 115–125, 2012.

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

PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 439–449, 2013.

PÓVOA NETO, H. H.; RANGEL, S. A.; CORREA SOBRINHA, M. A.; DELATORRE, A. B.; AGUIAR, C. de J.; RODRIGUES, P. M. Sacolas plásticas: consumo inconsciente. **Perspectivas Online: Biológicas e Saúde**. v. 1, n. 3, 2011.

PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; MOMAUR, T.; DUFRESNE, A. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1198–1202, 2003.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, p. 1028–1029, 2004.

ROBIN, J. P.; MERCIER, M.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starch gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 389–406, 1974.

ROBYT, J. F. Starch chemistry and technology. In: **Enzymes and their action on starch**. BEMILLER, J.; WHISTLER, R. Eds.; Elsevier:New York, 2009, pp. 238–292.

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 on Its semicrystalline Structure. **Journal Agricultural Food Chemistry** v. 59, p. 4208–4216, 2011.

SALAME, M. **Barrier polymers**. In: BAKER, M. The Wiley encyclopedia of packaging technology. New York, USA: Wiley, 1986. p. 48–54.



SANTACRUZ, S.; KOCH, K.; SVENSSON, E.; RUALES, J.; ELIASSON, A. C. Three underutilized sources of starches from the Andean region in Ecuador. Part 1. Physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 1, p. 63–70, 2002.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L. SINGH, N. S.; SINGH, B. G. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

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

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1–14, 2000.

SRICHUWONG, S.; ISONO, N.; MISHIMA, T.; HISAMATSU, M. Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to acid and enzyme hydrolysis of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 115–121, 2005.

SUBRAMANI, K.; AHMED, W. Emerging nanotechnologies in dentistry. In:\_\_\_\_. **Nanotechnology and the future of dentistry**. Elsever:USA, 2011, p. 1–14.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal science**, v. 39, p. 151–165, 2004.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551–557, 1990.

TESTER, R. F. Properties of damaged starch granules: composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 3, p. 293–301, 1997.

TESTER, R. F.; QI, X.  $\beta$ -limit dextrin - Properties and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1899–1903, 2011.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composites coating: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, p. 71–78, 2003.

THIELMANS, W.; BELGACEM, M. N.; DUFRESNE, A. Starch nanocrystals with large chain surface modifications. **Langmuir**, v. 22, p. 4804–4810, 2006.

ULBRICH, M.; NATAN, C.; FLÖTER, E. Acid modification of wheat, potato, and pea starch applying gentle conditions—impacts on starch properties. **Starch/Stärke**, v. 66, p. 903–913, 2014.

UTRILLA-COELLO, G.; HERNÁNDEZ-JAIMES, C.; CARRILLO-NAVAS, H.; GONZÁLEZ, F.; RODRÍGUEZ, F.; BELLO-PÉREZ, L. A.; VERNON-CARTER, E. J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 596–602, 2014.

VANDEPUTTE, G. E.; DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p. 245–266, 2004.

VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; REYNAERS, B.; DELCOUR, J. A. Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1775–1786, 2004.

WANG, S.; YU, J.; YU, J. Conformation and location of amorphous and semi-crystalline regions in C-type starch granules, revealed by SEM, NMR and XRD. **Food Chemistry**, v. 110, p. 39–46, 2008.

WANG, S.; COPELAND, L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 55, n. 8, p. 1081–1097, 2015.

WEI, B.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Surface chemical composition and dispersion of starch of nanocrystals formed by acid sulfuric and hydrochloric acid. **Plos One**, v. 9, 2014.

WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. Starch. In \_\_\_\_\_. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. AACC. St Paul: Eagan Press, 1997. p. 117–151.

WIKMAN, J.; BLENNOW, A.; BERTOFT, E. Effect of amylose deposition on potato tuber starch granule architecture and dynamics as studied by lintnerization. **Biopolymers**, v. 99, p. 73–83, 2013.

WIKMAN, J.; BLENNOW, A.; BULLEON, A.; PUTAUX, J-L.; PÉREZ, S.; SEETHARAMAN, K.; BERTOFT, E. Influence of amylopectin structure and degree of phosphorylation on the molecular composition of potato starch lintners. **Biopolymers**, v. 101, n. 3, p. 257–271, 2013.

WURZBURG, O. B. **Modified starch: properties and uses**. Boca Raton: CRS Press, 1986 277p.

YOO, S. H.; PERERA, C.; SHEN, J.; YE, L.; SUH, D. S.; JANE, J. Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1556–1564, 2009.

ZOU, J.; ZHANG, F.; HUANG, J.; CHANG, P. R.; SU, Z.; YU, J. Effects of starch nanocrystals on structure and properties of waterborne polyurethane-based composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 85 p. 824–831, 2011.

# Capítulo II

*Características estruturais, térmicas e morfológicas  
de amilodextrinas de mandioca, milho e batata*

## RESUMO

As amilodextrinas de amido de mandioca, milho e batata foram obtidas pela hidrólise ácida e as suas características estruturais, térmicas e morfológicas foram avaliadas. O amido de mandioca foi o mais suscetível à hidrólise devido às imperfeições na sua estrutura cristalina. Os padrões cristalinos das amilodextrinas mantiveram-se inalterados e a cristalinidade e as temperaturas de pico aumentaram com o tempo de hidrólise, enquanto a temperatura de degradação térmica diminuiu, independentemente do tempo de tratamento e da fonte de amido. As amilodextrinas com padrão tipo A (amido de mandioca e milho) foram estruturalmente e termicamente mais estáveis do que as amilodextrinas com padrão tipo B (amido de batata). Nanocristais de amido (NCA) foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão a partir do terceiro dia de hidrólise nas amilodextrinas de mandioca, enquanto as amilodextrinas de milho e batata apresentaram NCA somente no quinto dia. Os NCA tipo A tinham forma de plaqueta, enquanto os NCA tipo B eram redondos. O formato dos NCA estava relacionado com a forma do empacotamento e da geometria da célula unitária dos alomorfos A e B. As amilodextrinas são formadas por estruturas micro- (partículas cristalinas aglomeradas) e nano- (organização das duplas hélices). O amido de mandioca mostrou ser um material promissor para a produção de NCA uma vez que requer menos tempo de hidrólise para a obtenção de cristais mais estáveis.

Palavras-chaves: amido; hidrólise ácida; cristalinidade; propriedades térmicas; nano-estrutura

## 1. INTRODUÇÃO

O amido é constituído por moléculas de amilose e amilopectina, as quais são sintetizadas em uma estrutura granular semicristalina. As lamelas cristalinas do amido estão organizadas dentro de bloquetes esféricos com diferentes tamanhos (20-500 nm) dependendo da fonte de amido (PEREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009). As camadas cristalinas concêntricas são formadas dentro das lamelas por duplas hélices empacotadas

de forma ordenada, enquanto as lamelas amorfas são compostas por pontos de ramificação da amilopectina e amilose em uma configuração desordenada (JANE, 2006; COPELAND et al., 2009).

Os grânulos de amido possuem diferentes polimorfismos exibindo diferentes padrões cristalinos (A, B e C), os quais dependem do comprimento das cadeias ramificadas de suas amilopectinas. Amidos com cadeias ramificadas mais longas apresentam padrão de raios-X tipo B, enquanto os amidos com cadeias ramificadas mais curtas exibem padrão de raios-X tipo A, (HIZUKURI, 1985; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997). Os polimorfismos tipo A e B diferem um do outro na forma do empacotamento e geometria da célula unitária. Os cristalitos do padrão tipo A exibem uma célula unitária monocíclica, com empacotamento fechado, enquanto os cristalitos do padrão tipo B exibem um arranjo hexagonal com estrutura mais aberta contendo 36 moléculas de água ligadas às duplas hélices (BULÉON et al., 1998; GENKINA et al., 2007). O padrão tipo C consiste na combinação da estrutura dos padrões cristalinos tipos A e B (BULÉON et al., 1998).

Frações cristalinas do amido podem ser obtidas pela extensa hidrólise com ácido clorídrico (amilodextrinas Linter) ou sulfúrico (amilodextrinas Näegeli) em temperatura menor que a da gelatinização do amido. Durante este processo, as áreas menos organizadas dos grânulos (regiões amorfas) são preferencialmente degradadas, mas a estrutura cristalina principal permanece intacta (ROBIN et al., 1974; SRICHUWONG et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2016; HAAJ et al., 2016). As frações resistentes ao ácido podem apresentar diferentes tamanhos e formas dependendo do conteúdo de amilose, comprimento da cadeia de amilopectina, padrão cristalino e tamanho dos bloquetes do amido de origem. As frações ácidos resistentes são constituídas por duas principais cadeias que correspondem as dextrinas lineares (GP 11-15) e dextrinas uniramificadas (GP 21-27). Além dessas cadeias, pequenas quantidades de dextrinas com múltiplas ramificações (GP > 35) também podem ser observadas (ROBIN et al., 1974; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; VERMEYLEN et al., 2004; KIM et al., 2012).

Alguns autores usam o termo "amilodextrinas" enquanto outros "nanocristais de amido" (NCA) para referir a mesma partícula. Esta confusão ocorre por uma divergência entre as nomenclaturas devido à variação de tamanho e cristalinidade das

partículas que alteram com a fonte botânica. Neste estudo, o termo NCA será usado para referir as partículas com tamanhos menores que 100 nm. NCA estão presentes nos resíduos insolúveis da hidrólise ácida e resultam da degradação completa das áreas amorfas dos grânulos (PUTAUX et al., 2003). Desse modo eles podem ser obtidos continuamente durante a hidrólise ácida. O tamanho dos NCA é associado ao tamanho dos bloquetes do amido de origem e resistência do grânulo ao ácido (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011). Putaux et al. (2003) reportaram que os NCA de milho ceroso são compostos de nanoplaquetas que formam blocos cristalinos paralelepípedicos que medem 20-40 nm de comprimento, 15-30 nm de largura e 5-7 nm de espessura semelhante ao arranjo estrutural monocíclico do padrão cristalino tipo A. Por outro lado, os NCA de milho com alto teor de amilose se mostraram mais espessos do que os NCA de milho normal e ceroso (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; KIM et al., 2012). Existe uma controvérsia no formato do NCA. Apesar de alguns autores terem relatado que a forma dos NCA está relacionada à geometria e forma do empacotamento do alomorfo do amido de origem (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; PUTAUX et al., 2003), outros mostraram que, independentemente do padrão cristalino, os NCA têm formatos arredondados (KIM et al., 2012).

As frações resistentes ao ácido têm alta estabilidade térmica devido à degradação da região amorfa do grânulo e, conseqüentemente, aumento da ordem molecular dos cristais (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012; KIM et al., 2012). Estudos relataram que os cristalitos tipo A possuem maior estabilidade térmica do que os cristalitos tipo B devido ao denso empacotamento das hélices duplas na lamela cristalina (KIM et al., 2012). No entanto, um comportamento oposto foi relatado nos estudos de LeCorre, Bras e Dufresne (2012). Estes autores relataram que os cristalitos tipo B são termicamente mais estáveis devido ao comprimento mais longo de suas duplas hélices.

Atualmente, os NCA têm recebido muita atenção devido a sua nanoescala. Estas nanopartículas podem ser aplicadas em processos indústrias e alimentares, tais como reforçadores de matriz de polímeros sintéticos ou biopolímeros e substitutos de gordura. A maioria dos estudos sobre amilodextrinas ou NCA tem sido relatados para ação ácida no amido de milho ceroso (PUTAUX et al., 2003) e amidos de fontes botânicas convencionais, como batata, milho normal, milho de alto teor de amilose e trigo. (KIM

et al., 2012; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012). O objetivo deste estudo foi avaliar as características estruturais, térmicas e morfológicas das amilodextrinas/NCA de mandioca, milho e batata.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

As matérias-primas utilizadas neste projeto foram grãos de milho da cultivar IPR 114, cedida pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR); raízes de mandioca da cultivar Cascudinha, cedidas pela empresa PROFARMA – produtos de mandioca Fadel LTD, e tubérculos de batata da cultivar IAC Ibituaçu, cedidas pela Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Foi utilizada enzima isoamilase de *Pseudomonas* (EC 3.2.1.68) (Megazyme International, Wicklow, Irlanda). Todos os reagentes foram puros para análise.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Isolamento dos amidos**

Os amidos foram isolados das raízes de mandioca e dos tubérculos de batata seguindo o procedimento descrito por Peroni, Rocha e Franco (2006). As raízes e os tubérculos foram lavados, descascados e cortados em cubos pequenos, os quais foram moídos com água na proporção de 1:1 (v:v), em liquidificador industrial de aço inox, por 40 s. A suspensão obtida foi passada através de peneiras de abertura de 80 mesh (0,177 mm) e 150 mesh (0,105 mm), para as raízes de mandioca e 80 mesh e 100 mesh (0,149 mm) para tubérculos de batata, para remoção do bagaço. O bagaço retido na peneira de 80 mesh foi misturado com água, na proporção de 1:1 (v:v), e moído por 20 s para retirada do amido residual. A suspensão de amido recuperada do bagaço foi misturada à primeira suspensão e mantida em câmara fria a 5 °C durante 12 h, para decantação do amido. O amido foi recuperado por sifonação, lavado com água destilada



até que o sobrenadante estivesse limpo, recuperado por centrifugação e seco em estufa com circulação de ar a temperatura de 40 °C por 12 h.

O amido de milho foi isolado segundo o procedimento descrito por Eckhoff et al. (1993) com modificações de Rocha et al. (2012). Os grãos de milho foram macerados em solução de metabissulfito de sódio (0,1% p/v) e ácido láctico (0,55% p/v), em tanques com capacidade para 1 kg de grãos, a 43 °C ( $\pm 1$  °C) por 36 h, com circulação forçada da água de maceração (300 mL/min). Ao final deste período os grãos foram drenados e triturados com água destilada na proporção de 1:1 (v:v) em liquidificador industrial de aço Inox, com capacidade de 4 L, para separação do germe que foi removido com auxílio de telas de 14 e 16 mesh (1,41 e 1,19 mm, respectivamente). O restante da amostra foi enviado para um moinho de discos para redução das partículas e obtenção de uma massa fina e homogênea que foi peneirada em peneira vibratória com malha de 250 mesh (0,056 mm) para separação da fibra. A suspensão foi mantida sob agitação e transferida para mesa de separação que consistia de calhas no formato de “U” com declividade de 2° e comprimento de 6 m num fluxo constante de 300 mL/min. O amido foi retirado da mesa de separação com o auxílio de espátulas plásticas e seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 12 h.

Os amidos obtidos após secagem foram moídos em almofariz, passados por peneira de 70 mesh (0,212 mm) e armazenados em potes tampados a temperatura de refrigeração para posterior utilização.

## 2.2.2. Caracterização dos amidos nativos

### 2.2.2.1. *Composição química dos amidos nativos*

O teor de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas 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 Smith e Caruso (1964).

### 2.2.2.2. Distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina

Os amidos foram desramificados utilizando isoamilase (EC 3.2.1.68) obtida de *Pseudomonas* sp. (Megazyme International, Wicklow, Irlanda), seguindo o procedimento de Wong e Jane (1995), com modificações. Uma dispersão de 5 mL de amido em DMSO 90% (10 mg/mL) foi agitada em banho de fervura por 1 hora e depois por mais 16 horas, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de amido foi misturada a 2 mL de etanol anidro e o amido precipitado foi recuperado por centrifugação a 12.000 g por 10 min. O amido recuperado foi suspenso em 1,8 mL de água ultra pura (18 M $\Omega$ .cm) e mantido 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  $\mu$ L de solução de azida 10% (p/v) e 3  $\mu$ L de isoamilase (Megazyme, 3U), 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 colocada em banho de água fervente por 15min, para inativação da enzima. Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22  $\mu$ m.

A distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos desramificados com isoamilase foi analisada usando sistema cromatográfico HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Alíquotas de 20  $\mu$ L das amostras preparadas e filtradas anteriormente foram automaticamente injetadas no equipamento constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-200 (250 x 3 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-200. A forma de onda empregada foi a *standard quadruple* com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V ( $t_1$  = 0,40 s); E2 = -2,00 V ( $t_2$  = 0,02 s); E3 = 0,60 V ( $t_3$  = 0,01 s); E4 = -0,10 V ( $t_4$  = 0,06 s). Os parâmetros da fase móvel utilizada para a separação foi constituída pelo eluente A (200 mM NaOH) e eluente B (1M acetato de sódio e 100 mM NaOH) com fluxo de 0,5mL/min e temperatura de 35 °C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 M $\Omega$ .cm) e degaseificados com N<sub>2</sub>. O gradiente ótimo foi: 0 - 10 min, gradiente linear de 0 a 70 mM de acetato de sódio; 10 - 80 min, gradiente linear terminando com 350 mM de acetato de sódio. 80 a 110 min a concentração de 350 mM de acetato foi mantida. A

concentração de hidróxido de sódio foi mantida constante em 100 mM durante toda a corrida. Uma mistura de maltodextrinas (grau de polimerização 1-7) foi usada 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, Sunnyvale, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

#### *2.2.2.3. Propriedades de pasta*

As propriedades de pasta dos amidos isolados foram determinadas utilizando um Rápido Visco Analisador (RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Austrália) de acordo com o procedimento descrito por Franco et al. (2002). 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, as amostras foram mantidas a 50 °C durante 1 min; após este tempo, foram aquecidas a 95 °C a uma razão de 6 °C/min e permaneceram nesta temperatura por 5 min; então as amostras foram resfriadas a 50 °C também a uma taxa de 6 °C/min e permaneceram nesta temperatura até o final da análise. Foram necessários 23 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, Warriewood, Austrália) foi utilizado para o processamento dos resultados.

#### *2.2.3. Hidrólise ácida dos amidos*

A cinética da hidrólise ácida dos amidos foi realizada seguindo o procedimento descrito por Angellier-Coussy et al. (2009), com o objetivo de determinar os melhores tempos para recuperação dos resíduos da hidrólise. Porções de 10 g dos amidos foram suspensas em 67,6 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,16 M (14,8% p/v), as quais foram incubadas a 40 °C por 10 dias, com agitação a 100 rpm. Alíquotas da suspensão (2 mL) foram retiradas nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 e centrifugadas (12000 g, 10 min) e os carboidratos solubilizados no sobrenadante foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) modificado para leitura em microleitora de absorbância

segundo o procedimento descrito por Fox e Robyt (1991). A extensão da hidrólise foi determinada pela razão entre a quantidade de açúcares totais solubilizados e peso total de amido em base seca.

Suspensões de amidos (14,8% p/v) de mandioca, batata e milho em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,16 M foram preparadas e colocadas em banho com agitação a 40 °C por 1, 3, 5 e 7 dias, com agitação a 100 rpm (ANGELLIER-COUSSY et al., 2009). Após hidrólise, as suspensões foram centrifugadas por 10 min a 12000 g. O precipitado, doravante denominado amilodextrinas, foi lavado com água destilada até a neutralidade e liofilizado para posterior análise.

#### *2.2.3.1. Afinidade por iodo e teor de amilose aparente*

Os amidos e as amilodextrinas obtidas da hidrólise ácida foram previamente desengordurados conforme descrito por Franco et al. (2002) com modificações. Amostras de 0,5 g de amido foram dispersas em 25 mL de DMSO 90 %, colocadas sob agitação em banho de água fervente por 1 h, e, agitadas por mais 16 h à temperatura ambiente. As amostras foram precipitadas com ~75 mL de etanol anidro e centrifugadas a 12000 g por 10 min. Em seguida, foram novamente lavadas em etanol anidro, filtradas a vácuo, e secas em estufa com circulação forçada de ar a 38 °C.

A afinidade por iodo dos amidos e amilodextrinas desengordurados foi determinada usando um autotitulado potenciométrico (716 DMS Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland). Os teores de amilose aparente foram determinados usando a metodologia descrita por Kasemsuwan et al. (1995). O teor de amilose aparente foi calculado dividindo a afinidade por iodo das amostras desengorduradas por 20% (TAKEDA; HIZUKURI; JULIANO, 1987). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.2.3.2. *Análise por espectroscopia vibracional por refletância total atenuada (FTIR-ATR)*

Os amidos e as amilodextrinas foram analisados em Espectroscópio de infravermelho acoplado ao transformador Fourier (modelo FT-IR UATR Two, Perkin Elmer, Waltham, EUA). As amostras foram colocadas no suporte de cristal ATR com pressão de 75 N. As análises foram realizadas na faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As análises foram realizadas em duplicata.

### 2.2.3.3. *Difração de raios-X e cristalinidade relativa*

Os amidos e as amilodextrinas foram previamente condicionados em dessecador contendo solução de  $\text{BaCl}_2$  saturada (25 °C,  $a_w = 0,9$ ) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X das amostras foram determinados utilizando-se um difrattômetro de raios-X de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação monocromática de Cu, linha K,  $L = 1,542 \text{ \AA}$ , utilizando porta amostra de vidro. As amostras foram analisadas de 3° a 40° em  $2\theta$  com velocidade de varredura de 1°/min e as condições de uso foram 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total dos difrattogramas seguindo o método de Nara e Komiya (1983). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.2.3.4. *Propriedades térmicas*

As propriedades térmicas dos amidos e das amilodextrinas foram determinadas utilizando um Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, Norwalk, EUA). Amostras de 4 mg (b.s.) foram pesadas em porta amostra de alumínio, próprios para o equipamento. Água deionizada (12  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada e os recipientes foram selados em prensa universal (Perkin Elmer, Norwalk, EUA). Os recipientes selados foram mantidos por 12 h em temperatura ambiente e então aquecidos a uma razão de 10 °C/min de 25 a 125 °C. Um porta amostra de alumínio vazio foi utilizado

como referência. O aparelho foi calibrado com índio. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) das amostras gelatinizadas foram determinados utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 2.2.3.5. *Análise termogravimétrica*

A análise termogravimétrica dos amidos e das amilodextrinas foi realizada utilizando um analisador termogravimétrico (TGA 4000, Perkin Elmer, Norwalk, EUA). As amostras (~10 mg) foram colocadas no porta-amostra e aquecidas de 30 a 600 °C a uma razão de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (20 mL/min). As perdas de massa foram calculadas a partir da derivada de cada curva utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk, EUA). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 2.2.3.6. *Distribuição de cadeias das amilodextrinas*

A distribuição do comprimento das cadeias das amilodextrinas foi analisada por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) usando um sistema ICS 3000 (Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40. As amilodextrinas (1 mg) foram dispersas em 1 mL de água ultra-pura (18 M $\Omega$ .cm), colocadas em banho de água fervente por 15 min, resfriadas e filtradas (0,22  $\mu$ m membrana). Alíquotas de 20  $\mu$ L das soluções foram automaticamente injetadas no sistema. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C. O eluente A foi composto de 200 mM de hidróxido de sódio e o eluente B de 100 mM de hidróxido de sódio e 1000 mM de acetato de sódio. Os eluentes foram preparados com água ultra-pura (18 M $\Omega$ .cm) e degaseificados com N<sub>2</sub>. As cadeias de amilodextrinas foram separadas usando uma guarda coluna Dionex CarboPac™ PA-100 (4 mm x 50 mm) em combinação com uma coluna de troca aniônica Dionex CarboPac™ PA-100 (4 mm x 250 mm). O gradiente ótimo foi baseado no método de Koch, Andersson e Åman (1998) como descrito a seguir: 0 - 15 min, gradiente linear de 140 a 200 mM de acetato de sódio e constante de 150 mM de hidróxido de sódio; 15 -

95 min, gradiente linear de 200 a 360 mM de acetato de sódio e constante de 150 mM de hidróxido de sódio; 95 - 110 min, gradiente linear 360 a 500 mM de acetato de sódio e 150 a 50 mM de hidróxido de sódio; 110 - 125 min, gradiente linear finalizando em 140 mM de acetato de sódio e 150 mM de hidróxido de sódio. Misturas de maltodextrinas (GP1-GP7) contendo diferentes concentrações (31, 42, 23, 42, 39, 33 e 48 µg/mL, respectivamente) de cada açúcar foram utilizadas para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. O “grau de polimerização aparente” (GP<sub>ap</sub>) das estruturas ramificadas das amilodextrinas (cadeias sem tratamento de enzimas desramificantes) foi determinado. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

#### *2.2.3.7. Morfologia e distribuição de tamanho dos grânulos de amido e amilodextrinas*

A morfologia dos grânulos de amido nativo foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Philips XL – 30 FEG, Eindhoven, Netherlands). As amostras foram dispersas em etanol anidro e aplicadas em uma superfície de fita adesiva. As amostras foram cobertas com uma camada de 14 nm de ouro usando o equipamento Balzers Sputter Coater (modelo SC 50, SCD 004, Eindhoven, Netherlands). A tensão de aceleração do feixe utilizada foi de 5 kV, com escalas de 100, 20 e 10 µm.

A distribuição de tamanho dos grânulos foi realizada em microscopia óptica através do Sistema de Análise de Imagem Axio Vision Rel. 4.8.2 – SP2 da ZEISS (Göttingen, Alemanha). As amostras foram coletadas com fio de platina e misturadas sobre lâminas de vidro em solução de glicerina (50% v/v), sendo cobertas por lamínula. Preparadas as lâminas, estas foram observadas em microscópio óptico (AXIOSKOP 2 Plus – ZEISS, Oberkochen, Alemanha) e as imagens selecionadas foram analisadas pelo sistema. Os grânulos foram distribuídos quanto aos diâmetros: 0-1,99 µm; 2,0-4,99 µm; 5,0-9,99 µm; 10,0-14,99 µm; 15,0-19,99 µm; 20,0-24,99 µm; 25,0-29,99 µm; 30,0-34,99 µm; 35,0-39,99 µm e >40,0 µm.

A morfologia e o tamanho das amilodextrinas foram analisados utilizando microscópio eletrônico de transmissão (TEM JEM - 100CX II, Jeol, Tokyo, Japan) operado a 80 kV. Uma suspensão de amilodextrinas (20% p/v) foi homogeneizada por 180 s em sistema de sonicação tipo banho (Branson model 3510, Emerson, Ferguson, EUA) para dispersão das partículas na água. Uma gota da suspensão (150 µL) foi depositada em suporte coberto com parafilm e uma grade de microscopia revestida de carbono foi colocada sobre a gota por 30 s. Então a grade de microscopia revestida de carbono foi seca em temperatura ambiente. Para a amostra, 20 partículas aleatórias foram selecionadas (KIM et al., 2012) e os tamanhos das partículas foram mensurados utilizando o software GIMP 2.8.18.

#### 2.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicata, com exceção das análises por espectroscopia vibracional por refletância total atenuada e distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas e distribuição das amilodextrinas. Os dados foram avaliados usando o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2007) incluindo a análise de variância (ANOVA) e a análise de comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Caracterização dos amidos**

##### 3.1.1. Composição química dos amidos

Os amidos isolados apresentaram-se como pós de coloração branca e inodora. Os valores de umidade dos amidos variaram de 9,62 a 14,32% (Tabela 1), sendo que esses valores são considerados adequados por evitar a degradação estrutural do amido e a alta atividade de água que causa a proliferação de micro-organismos (TESTER, 1997).



A pureza do amido está relacionada com a quantidade de lipídeos, minerais e proteínas. Baixos teores de lipídeos e minerais e ausência de proteínas aderidas aos grânulos de amido são desejáveis.

Os amidos isolados apresentaram baixos teores de cinza e proteína (< 1%), indicando que os mesmos estavam suficientemente puros (Tabela 1). Os amidos de batata e mandioca, como esperado, apresentaram baixos teores de proteína, enquanto o amido de milho apresentou 0,76%. Valores semelhantes foram encontrados por Eckhoff et al. (1993), quando testaram a repetibilidade e o rendimento de amido de milho em escala laboratorial.

**Tabela 1** – Composição química<sup>a</sup> dos amidos isolados.

Amido	Umidade (%)	Cinzas* (%)	Proteína* (%)	Lipídeos* (%)	Fósforo* (%)
Mandioca	9,62 ± 0,18 <sup>c</sup>	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,012 ± 0,001 <sup>c</sup>
Milho	11,49 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,76 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,034 ± 0,001 <sup>b</sup>
Batata	14,32 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,055 ± 0,002 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Média de três replicatas seguida de desvio padrão. \* dados apresentados em base seca. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

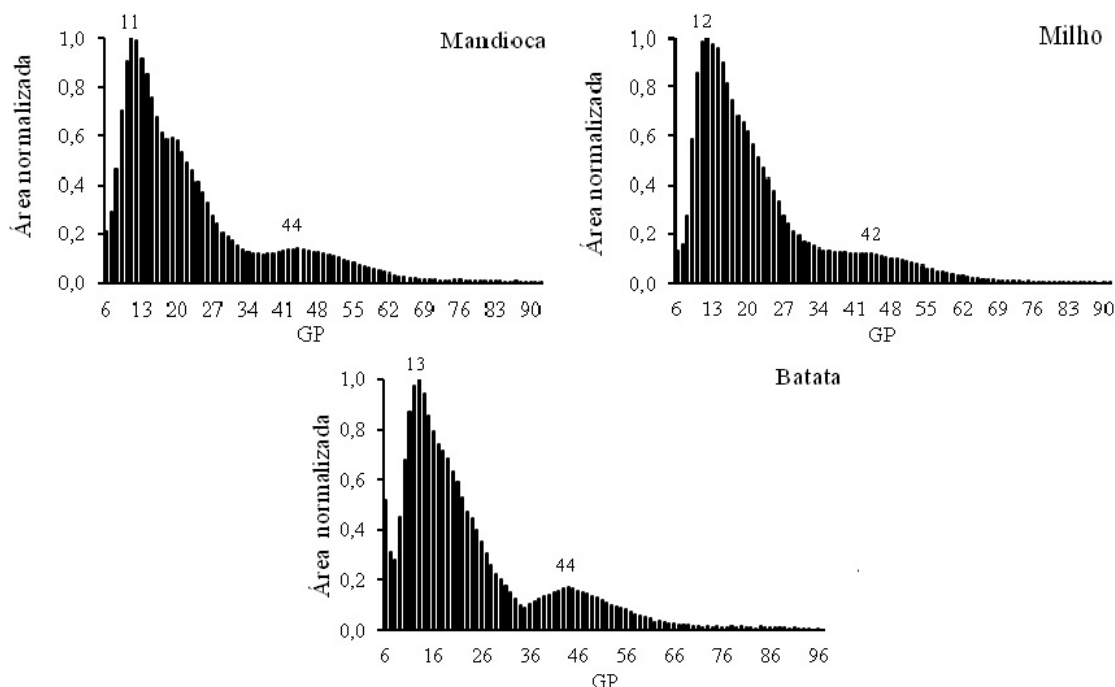
Dentre os constituintes menores presentes nos amidos, os lipídeos e o fósforo são os que mais influenciam suas propriedades físico-químicas. O teor de lipídeo dos amidos estudados variou de 0,045 a 0,315%, sendo que o amido de milho apresentou maior teor de lipídeo, como era esperado. De acordo com Morrison (1988) o teor de lipídeo em amido de milho normal pode variar de 0,6 a 0,7%, porém Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009) ao estudarem as diferenças das características físico-químicas, morfológicas e reológicas dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose, observaram que o amido de milho normal apresentou 0,12% de lipídeo em sua composição. Essa variação encontrada ocorre devido aos diferentes métodos de isolamento e também ao tipo de variedade utilizada. Os amidos de batata e mandioca apresentaram teores de lipídeos baixos, sendo essa uma característica de amidos de raízes e tubérculos que apresentam traços de lipídeos, os quais não têm efeito pronunciado nas propriedades funcionais desses amidos (HOOVER, 2001).

O fósforo pode ser encontrado nos amidos na forma de monoéster fosfato, fosfatos inorgânicos ou lisofosfolipídeos (LPL). Em amidos de cereais o fósforo está presente principalmente na forma de LPL (MORRISON, 1988). Já em amidos de tubérculos e raízes ele é encontrado principalmente na forma de monoéster fosfato (KASEMSUWAN; JANE, 1996).

O amido de batata apresentou o maior teor de fósforo (0,055 %), enquanto o amido de mandioca o menor (0,012%). De acordo com Damodaran, Parkin e Fennema (2010), o teor de fósforo em amido de batata pode variar de 0,060 a 0,10% e se deve principalmente à presença de grupos éster fosfato nas moléculas de amilopectina. Tester et al. (1999) avaliaram o efeito da temperatura sobre a síntese, composição e as propriedades físicas do amido de batata e observaram que as condições ambientais influenciam o teor de fósforo, pois conforme aumenta a temperatura ambiente, durante o desenvolvimento da planta, diminui o teor de fósforo. Peroni, Rocha e Franco (2006) encontraram valores mais baixos de fósforo (0,007%) em amido de mandioca que aqueles encontrados neste trabalho. O amido de milho apresentou teor de fósforo (0,034%) intermediário quando comparado com os outros amidos estudados. Diferenças no teor de fósforo estão relacionadas às variações genéticas dentro de cada espécie (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994).

### 3.1.2. Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina

As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioca, milho e batata estão apresentadas na Figura 1 e os resultados sumarizados na Tabela 2. Os amidos apresentaram distribuição bimodal com um pico principal no GP (grau de polimerização) 11, 12 e 13 para os amidos de mandioca, milho e batata, respectivamente, e um segundo pico no GP 44 para os amidos de mandioca e batata e no GP 42 para o amido de milho.



**Figura 1** – Distribuição normalizada do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioca, milho e batata desramificados com isoamilase, determinada por HPAEC-PAD.

O amido de mandioca apresentou maior quantidade de cadeias curtas (26,1%), em relação aos demais amidos estudados, e uma alta proporção de cadeias longas (17,6), confirmando a característica do seu padrão cristalino A. Campanha (2010) e Rolland-Sabaté et al. (2012) observaram proporções similares de cadeias curtas e menores proporções de cadeias longas, diferente de Jane et al. (1999) que encontraram maiores proporções de cadeias longas (26,7%), além de altas proporções de cadeias curtas (17,3%) para este amido.

**Tabela 2** - Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioca, milho e batata determinada por HPAEC-PAD.

	Comprimento de cadeia (%) <sup>a</sup>				GP	Maior GP detectado
	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP ≥ 37		
Mandioca	26,1 ± 0,1	42,4 ± 0,1	13,9 ± 0,0	17,6 ± 0,0	23,1	92
Milho	23,0 ± 0,2	47,5 ± 0,2	14,4 ± 0,1	15,2 ± 0,1	22,5	92
Batata	22,1 ± 0,1	45,9 ± 0,9	12,9 ± 0,9	19,2 ± 0,1	23,8	97

<sup>a</sup>Média de duas replicatas seguida do desvio-padrão. GP: Grau de polimerização médio.

O amido de mandioca apresentou ombro no GP 19-21, sendo que este ombro também foi observado por Jane et al. (1999) e Campanha (2010) no GP 18-21. As altas proporções de cadeias curtas GP < 10, as quais não são capazes de formar duplas hélices estáveis e podem estar como que penduradas no interior da região cristalina (GENKINA et al., 2007), podem causar defeito na estrutura cristalina o que acarreta em um ombro de maior ou menor intensidade na distribuição das cadeias laterais da amilopectina (JANE et al., 1999).

Os amidos de batata e milho não apresentaram ombro em sua estrutura, como também observado por Jane et al. (1999). Genkina et al. (2007) descreveram que os amidos que são empacotamento mais fortemente, não apresentam defeitos na sua estrutura cristalina.

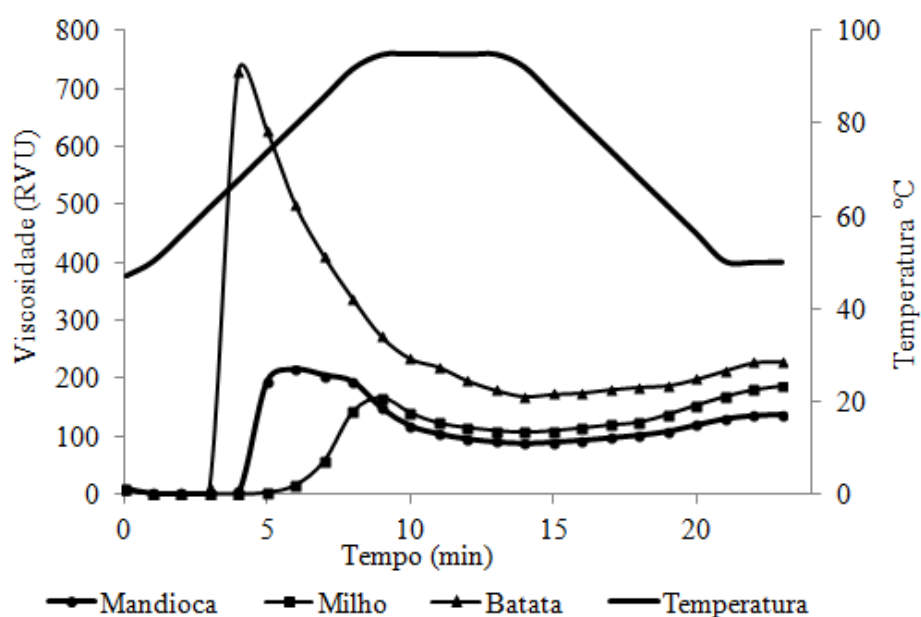
Já o amido de batata apresentou maior quantidade de cadeias longas (19,2%), menor quantidade de cadeias curtas (22,1%) e maior GP médio (23,8), diferente do amido de milho que apresentou alta proporção de cadeias curtas (23,0%) e a menor proporção de cadeias longas (15,2%) e menor GP médio (22,5), essas proporções na distribuição do comprimento de cadeia dos amidos de batata e milho são características do padrão cristalino tipo B e tipo A, respectivamente. Jane et al. (1999) e Rolland-Sabaté et al. (2012) também observaram este comportamento nos amido de batata e milho.

O maior GP detectado variou de 92 a 97, valores superiores ao encontrado nos trabalhos citados anteriormente em que o maior GP detectado foi de 86. Neste estudo, a coluna CarboPac PA-200 (250 x 3 mm) foi utilizada diferente dos outros estudos que

utilizaram a coluna CarboPac PA-100 (250 x 4 mm). A coluna PA-200 tem maior sensibilidade em relação a PA-100 devido ao seu menor diâmetro que permite detectar cadeias muito longas.

### 3.1.3. Propriedades de pasta

Os perfis viscoamilográficos dos amidos nativos determinados por Rápido Visco Analisador (RVA) estão apresentados na Figura 2. Os amidos isolados de diferentes fontes botânicas apresentaram perfil de viscosidade característico. O amido de milho apresentou alta temperatura de pasta (75,42 °C), baixa viscosidade no pico (184 RVU) e alta tendência à retrogradação. A temperatura de pasta determina o início do inchamento dos grânulos, sendo que altas temperaturas refletem uma maior resistência do amido a gelatinização causada por uma maior estabilidade estrutural (TESTER; MORRISON, 1990).



**Figura 2** – Perfil viscoamilográfico dos amidos de mandioca, milho e batata.

A gelatinização do amido é influenciada pelo teor de amilose e lipídeo que inibem o inchamento dos grânulos do amido, enquanto que a amilopectina o favorece (TESTER; MORRISON, 1990; SINGH et al., 2003). Os lipídeos presentes nos amidos

de cereais resultam em pastas mais opacas e com menor viscosidade devido à tendência desses compostos de formarem complexos com a amilose, resultando em um inchamento limitado. O amido de milho, também, apresentou uma viscosidade final (171 RVU) maior, devido seu alto teor de amilose, obtendo assim géis mais estáveis.

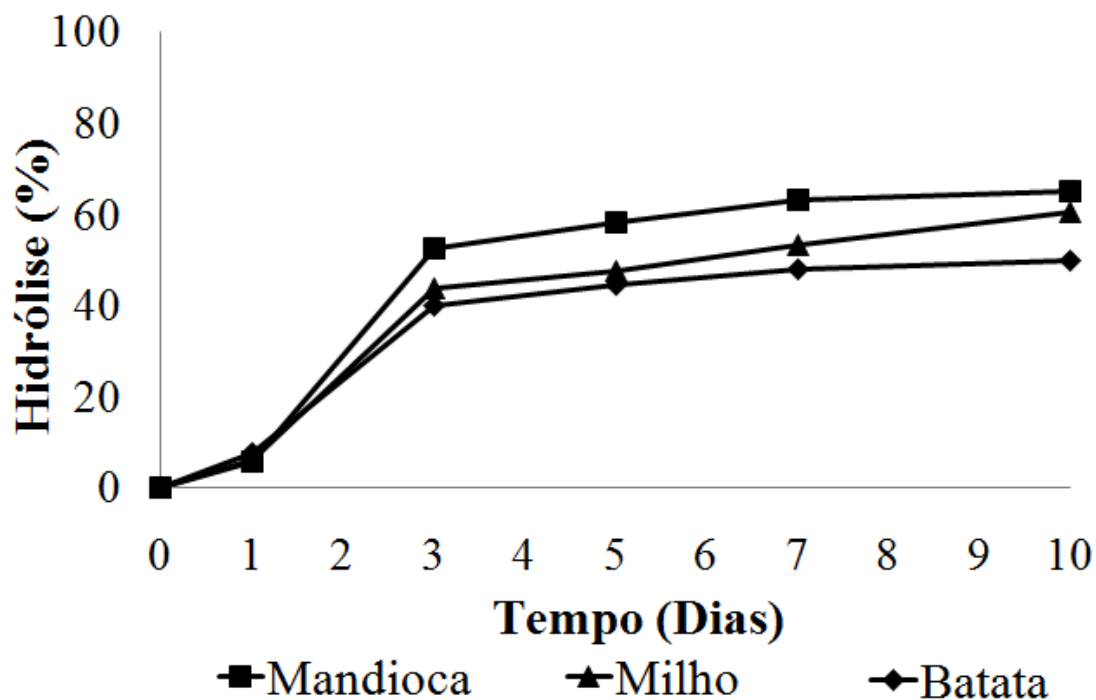
Os amidos de mandioca e batata apresentaram menores temperaturas de pasta e menor tendência à retrogradação. A baixa temperatura de pasta observada nesses amidos está relacionada à maior facilidade de cozimento. O amido de batata apresentou a maior viscosidade no pico e conseqüentemente a maior quebra, provavelmente devido ao maior teor de fósforo. Os grupos éster fosfato conferem uma carga levemente negativa aos grânulos de amido de batata, resultando em uma repulsão, o que pode contribuir para o rápido inchamento desses grânulos em água quente, resultando em géis com maior viscosidade no pico e menor tendência a retrogradação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os amidos de batata e mandioca apresentaram maior viscosidade na quebra (561 RVU e 128 RVU, respectivamente), indicando uma maior fragilidade dos grânulos, que resulta em pastas menos estáveis ao calor e atrito.

A retrogradação do amido é relacionada à capacidade das cadeias de amilose se recristalizarem durante o resfriamento e formar um gel de textura firme. Nos amidos de cereais os altos valores de viscosidade no *setback* indicam altas taxas de retrogradação e sinérese do amido (ROJAS et al., 1999). O amido de milho foi o que apresentou maior tendência a retrogradação, sendo que este amido também apresentou um alto teor de amilose.

### **3.2. Hidrólise ácida dos amidos**

A porcentagem de hidrólise em função do tempo dos diferentes amidos está apresentada na Figura 3. Os amidos de mandioca, milho e batata apresentaram dois estágios de hidrólise, o primeiro do dia 1 a 3 que correspondeu à rápida degradação da região amorfa dos grânulos e o segundo do dia 4 a 10 com taxa de hidrólise mais lenta devido à lenta degradação da região cristalina.



**Figura 3** – Porcentagem de hidrólise em função do tempo dos amidos de mandioca, milho e batata incubados a 40 °C durante 10 dias.

A hidrólise ácida do amido envolve o ataque unilateral eletroquímico dos prótons das ligações glicosídicas, com isso, o empacotamento menos ordenado das moléculas de amilose e amilopectina nas áreas amorfas são mais suscetíveis à hidrólise, enquanto o empacotamento das duplas hélices da região cristalina não permite que os íons  $H_3O^+$  penetrem rapidamente no interior do grânulo, resultando em taxas mais lentas da hidrólise em comparação àquelas da região amorfa (CAMPANHA; FRANCO, 2011; JIVAN; MANDADLOU; YARMAND, 2013). Li Coker e Berta (2007) descreveram que durante a hidrólise ácida ocorre mudança das ligações glicosídicas na organização da estrutura das unidades de D-glicose (de uma cadeira para meia cadeira), porém a estrutura cristalina do grânulo de amido imobiliza a conformação das ligações glicosídicas tornando essa transição mais difícil.

Os amidos de batata e milho apresentaram taxas de hidrólise similares na primeira fase da hidrólise, enquanto na segunda fase o amido de batata foi mais resistente. Os amidos de batata e milho exibem padrão cristalino tipo B e A,

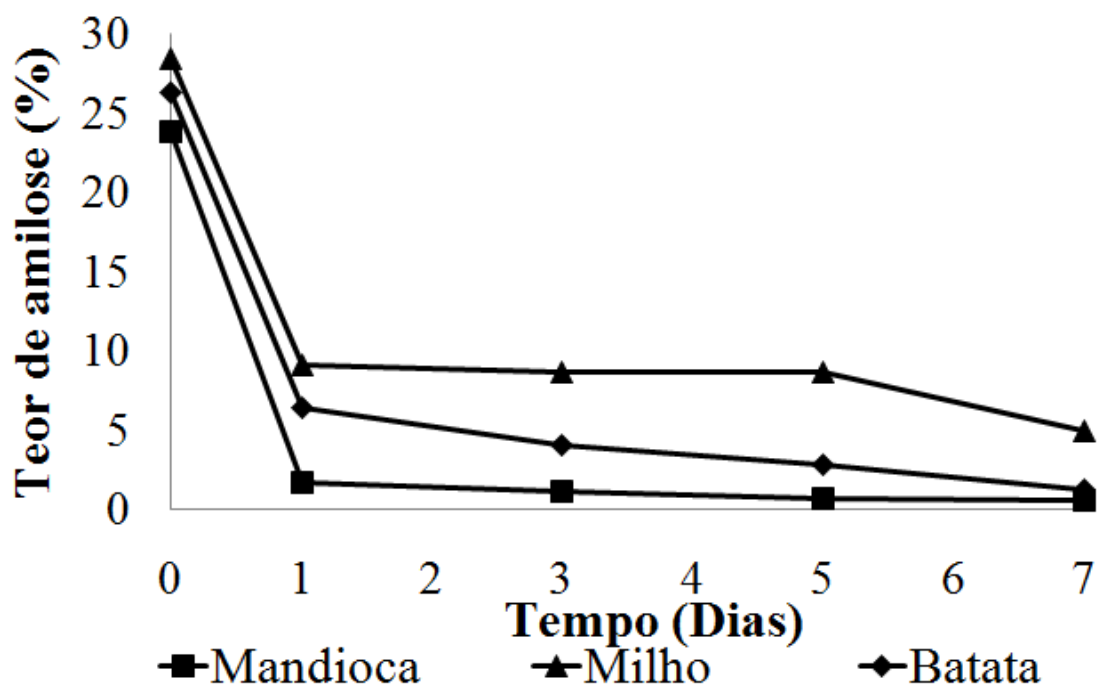
respectivamente. Os amidos tipo B apresentam longas cadeias ramificadas de amilopectina (B2, B3 e B4) que estende através dos múltiplos *clusters*, lamela mais espessa, que foram descritas como resistentes ao ácido (HIZUKURI, 1985; IMBERTY; PEREZ, 1989). Resultados similares foram encontrados por Srichunwong et al. (2005) e Campanha e Franco (2011), quando estudaram o efeito da hidrólise ácida em diferentes amidos. Imperfeições na estrutura cristalina do amido de mandioca, como discutido anteriormente, pode ter contribuído para menor estabilidade estrutural dos grânulos tornando-os mais suscetíveis ao ataque ácido.

### 3.2.1. Afinidade por iodo e teor de amilose aparente

Os amidos de mandioca, batata e milho contém 23,8, 26,2 e 28,4%, respectivamente de amilose (Figura 4). Similares resultados foram encontrados por e Rocha et al. (2011, 2012). As cadeias ramificadas mais longas da amilopectina no amido de batata (Tabela 2) pode também formar complexo com o iodo, como faz a amilose, o que pode superestimar seu teor de amilose.

Houve uma queda abrupta no teor de amilose (> 70%) de todos os amidos hidrolisados no primeiro dia de hidrólise, pois este polímero faz parte das áreas amorfas dos grânulos de amido que são mais suscetíveis a hidrólise ácida. O amido de mandioca foi o mais suscetível a hidrólise e apresentou menor teor de amilose após o primeiro dia de tratamento (1,7%). No último dia de hidrólise as amilodextrinas de mandioca, batata e milho continham 0,61%, 1,21% e 4,91% de amilose. Durante a hidrólise, os grânulos de amido incham e permitem a saída da amilose da região amorfa para a fase aquosa, onde é facilmente hidrolisada pelos íons  $H_3O^+$  (UTRILLA-COELLO et al., 2014). O complexo amilose-lipídeo, naturalmente presente no amido de milho (SINGH et al., 2003), pode ter contribuído para a redução mais lenta no conteúdo de amilose deste amido durante a hidrólise.





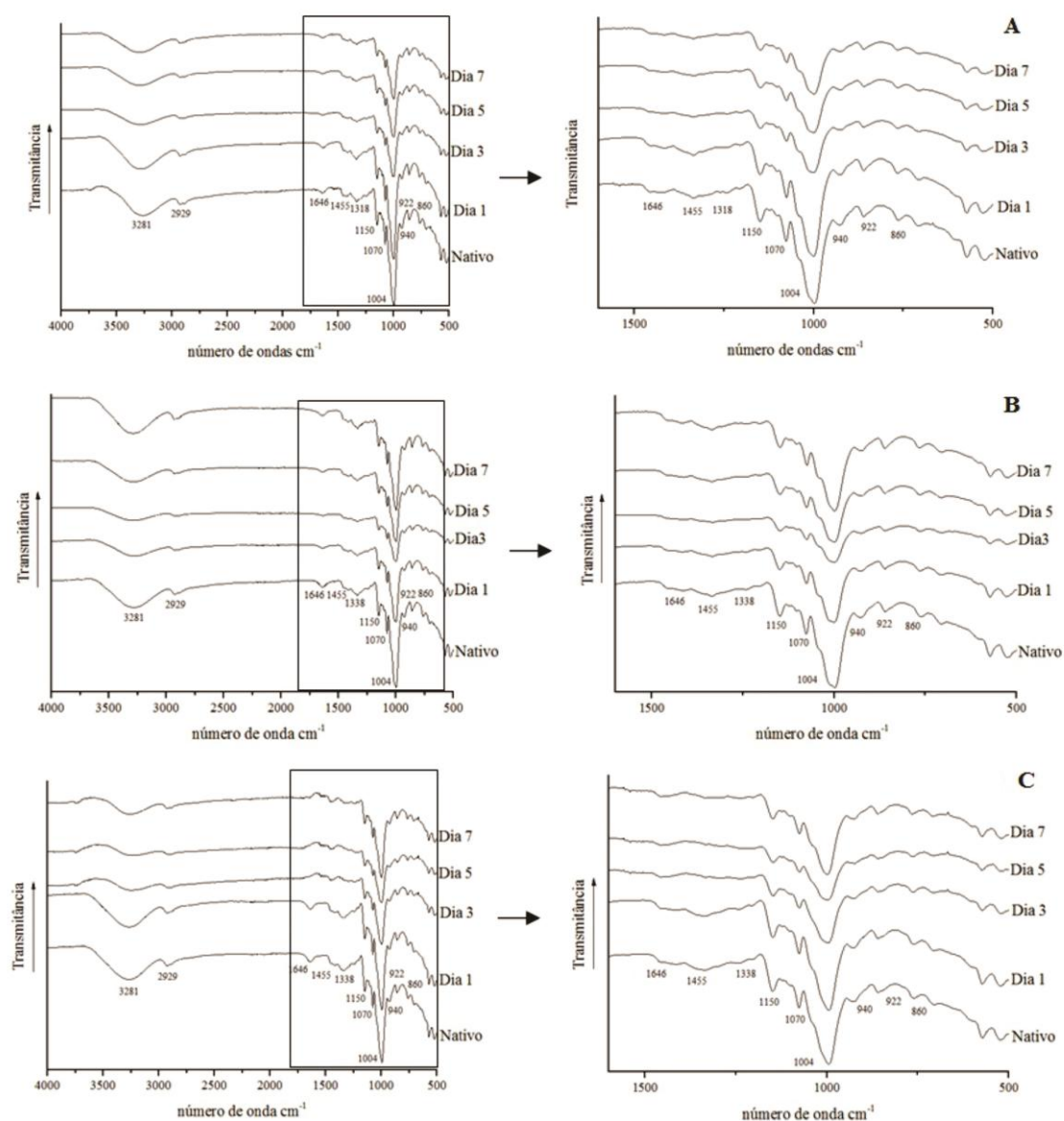
**Figura 4** – Teor de amilose aparente dos amidos de mandioca, milho e batata durante a hidrólise ácida.

### 3.2.2. Análise por espectroscopia vibracional por reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros de infravermelho dos amidos nativos e das amilodextrinas permitiu a identificação dos compostos. Os amidos e as amilodextrinas mostraram bandas em  $3281\text{ cm}^{-1}$  e  $3245\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 5), que corresponderam ao complexo vibracional alongado associado com os grupos hidroxilas livres, intra- e intermoleculares (FRANG et al., 2002). A presença dos grupos hidroxilas nas amilodextrinas favorece a maior aglomeração das partículas, em função das ligações de hidrogênio entre as hidroxilas das amilodextrinas que são mais fortes que a força de repulsão (WEI et al., 2014a).

As bandas  $1455\text{ cm}^{-1}$  e  $1338\text{ cm}^{-1}$  identificadas nas amilodextrinas são atribuídas ao alongamento e flexão do metileno com ligação C-H (WEI et al., 2014a), enquanto as bandas próximas a  $1150\text{ cm}^{-1}$  e  $1004\text{ cm}^{-1}$  são respectivamente atribuídas ao modo de

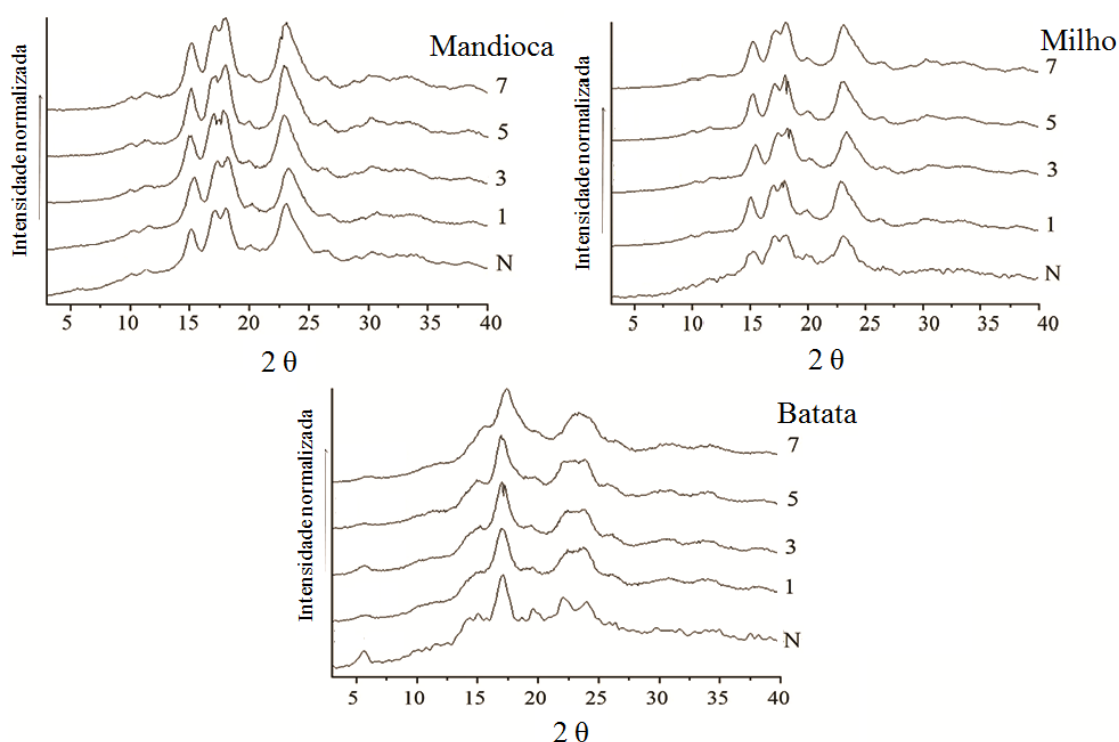
alongamento da ligação C-O e O-C, característica do anel de anidroglicose (FRANG et al., 2002; WEI et al., 2014a). A sutil redução dessas quatro bandas ocorre devido à quebra das ligações C-H e das ligações glicosídicas dos amidos. A presença das bandas próximo a  $1070\text{ cm}^{-1}$  e  $860\text{ cm}^{-1}$  nas partículas cristalinas são atribuídas à vibração da ligação C-O-S, devido à formação de grupos éster sulfato durante a hidrólise com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (WEI et al., 2014a).



**Figura 5** – FTIR-ATR dos amidos e amilodextrinas. (A): mandioca; (B): milho; (C): batata.

### 3.2.3. Padrão de raios-X e cristalinidade relativa

Como extensivamente apresentado na literatura, os amidos de mandioca, milho e batata exibiram, respectivamente, padrão cristalino tipo A e B (Figura 6), que concordam com os dados da distribuição de comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina como apresentado na Tabela 2. Os padrões cristalinos dos amidos permaneceram inalterados durante todo o período de hidrólise do ácido.



**Figura 6** – Difractogramas de raios-X e cristalinidade relativa dos amidos nativos (N) e das amilodextrinas de mandioca, milho e batata obtidas após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise.

**Tabela 3** – Cristalinidade relativa dos amidos nativos e das amilodextrinas obtidas após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise

<b>Tempo de hidrólise (d)</b>	<b>Cristalinidade Relativa</b>
Mandioca	
Nativo	36,06
1	48,49
3	51,63
5	56,99
7	53,99
Milho	
Nativo	34,70
1	45,07
3	49,32
5	57,28
7	54,30
Batata	
Nativo	33,27
1	39,19
3	41,10
5	56,48
7	48,54

A cristalinidade relativa (CR) dos amidos variou de 33,3 a 36,1%. Similares resultados foram observados por Rocha et al. (2011, 2012) para amidos de mandioca, milho e batata (Tabela 3). Independente da fonte botânica do amido, a CR das amilodextrinas aumentou até o quinto dia de hidrólise atingindo aproximadamente 57%, como resultado gradual da degradação das áreas amorfas dos grânulos do amido. LeCorre, Bras e Dufresne (2011), Miao et al. (2011) e Utrilla-Coello et al. (2014) encontraram CR variando de 45 a 50% nos resíduos resistentes à hidrólise ácida de diferentes amidos. No sétimo dia de hidrólise, a CR das amilodextrinas reduziu devido à provável ruptura das áreas cristalinas. Entretanto, a variação da CR nas amilodextrinas

durante a hidrólise foi diferente dependendo do padrão cristalino do amido. As amilodextrinas de batata tiveram um aumento sutil (7,8%) na CR, do primeiro ao terceiro dia de hidrólise, enquanto no mesmo período de tempo, a CR das amilodextrinas de mandioca e de milho apresentou o dobro de aumento. As amilodextrinas de batata tiveram uma maior redução (8%) na CR no último dia de tratamento, enquanto para as amilodextrinas de mandioca e de milho essa redução foi de ~3%, sugerindo que o arranjo cristalino tipo B foi mais facilmente desestabilizado pelo ácido.

#### 3.2.4. Propriedades térmicas

A temperatura inicial de gelatinização variou de 59,17 °C para o amido de batata a 64,66 °C para o amido de milho, enquanto a entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ) variou de 10,04 J/g a 18,76 J/g para os amidos de milho e batata, respectivamente (Tabela 4). O amido de mandioca teve a maior faixa de temperatura de gelatinização ( $\Delta T$ ) e o amido de batata a menor, sugerindo maior homogeneidade dos cristais no amido de batata. Resultados similares foram encontrados por Chung et al. (2014), Charoenkul et al. (2011) e Rocha et al. (2012) para batata, mandioca e milho. O pico endotérmico do complexo amilose-lipídeo ( $T_o = 87,13$  °C,  $T_p = 97,94$  °C,  $T_c = 103,15$  °C e  $\Delta H = 1,43$  J/g) exibido pelo amido de milho praticamente desapareceu nas amilodextrinas desde o primeiro dia de tratamento, devido à redução significativa da amilose durante a hidrólise (Figura 4) e devido à menor quantidade de complexo. Para conseguir identificar o complexo amilose-lipídeo seria necessário aumentar a quantidade de amostra devido à sensibilidade do DSC.

Independente da fonte da amilodextrina houve redução da  $T_o$  e aumento na  $T_c$  (Tabela 4) para todas as amostras devido à degradação das regiões amorfas e desestabilização da região cristalina durante a hidrólise (KIM et al., 2012). A temperatura de pico ( $T_p$ ) das amilodextrinas reduziu no primeiro dia de tratamento devido à desestabilização da estrutura granular do amido e então aumentou no terceiro dia de hidrólise. Este aumento foi maior nas amilodextrinas de milho e mandioca. Houve uma maior redução no  $\Delta H$  das amilodextrinas de batata com a hidrólise, e isto

também foi observado na CR das B-amilodextrinas (Figura 6). Esses resultados sugerem que os cristais tipo A apresentam maior estabilidade térmica e estrutural que os cristais B.

**Tabela 4** – Propriedades térmicas dos amidos e das amilodextrinas obtidas em diferentes dias de hidrólise.

<b>Tempo de hidrólise (d)</b>	<b>T<sub>o</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>p</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>ΔT (°C)</b>	<b>ΔH (J/g)</b>
<b>Mandioca</b>					
0	64,21 ± 0,66 <sup>a</sup>	69,16 ± 0,70 <sup>c</sup>	75,24 ± 1,08 <sup>c</sup>	11,04	15,20 ± 0,29 <sup>bcd</sup>
1	50,58 ± 0,09 <sup>def</sup>	61,17 ± 0,24 <sup>g</sup>	98,53 ± 0,68 <sup>a</sup>	47,96	11,69 ± 0,08 <sup>g</sup>
3	50,00 ± 1,35 <sup>ef</sup>	68,81 ± 0,20 <sup>c</sup>	99,76 ± 0,28 <sup>a</sup>	49,76	16,48 ± 0,78 <sup>b</sup>
5	49,20 ± 0,01 <sup>f</sup>	72,47 ± 0,12 <sup>b</sup>	99,47 ± 0,45 <sup>a</sup>	50,27	15,77 ± 0,20 <sup>bc</sup>
7	50,54 ± 1,32 <sup>def</sup>	73,05 ± 0,00 <sup>b</sup>	98,67 ± 0,74 <sup>a</sup>	48,13	14,80 ± 0,28 <sup>bcd</sup>
<b>Milho</b>					
0	64,66 ± 0,28 <sup>a</sup>	69,91 ± 0,08 <sup>c</sup>	74,70 ± 0,12 <sup>c</sup>	10,04	14,42 ± 0,29 <sup>cde</sup>
1	50,99 ± 0,37 <sup>def</sup>	64,01 ± 1,04 <sup>de</sup>	102,12 ± 2,32 <sup>a</sup>	51,13	14,98 ± 0,84 <sup>bccd</sup>
3	51,81 ± 1,22 <sup>de</sup>	72,94 ± 0,09 <sup>b</sup>	100,14 ± 1,79 <sup>a</sup>	48,33	15,57 ± 0,72 <sup>bc</sup>
5	52,74 ± 0,51 <sup>d</sup>	76,15 ± 0,83 <sup>a</sup>	99,84 ± 0,21 <sup>a</sup>	47,10	14,31 ± 0,52 <sup>cdef</sup>
7	55,41 ± 0,19 <sup>c</sup>	77,24 ± 0,23 <sup>a</sup>	99,26 ± 0,61 <sup>a</sup>	43,86	13,07 ± 0,31 <sup>efg</sup>
<b>Batata</b>					
0 (amido nativo)	59,17 ± 0,07 <sup>b</sup>	62,08 ± 0,00 <sup>fg</sup>	66,01 ± 0,01 <sup>d</sup>	6,83	18,76 ± 0,52 <sup>a</sup>
1	50,09 ± 0,34 <sup>ef</sup>	60,60 ± 0,34 <sup>g</sup>	74,09 ± 0,61 <sup>c</sup>	24,00	13,94 ± 0,57 <sup>def</sup>
3	50,51 ± 0,72 <sup>def</sup>	62,91 ± 0,25 <sup>ef</sup>	80,49 ± 0,80 <sup>b</sup>	29,99	14,64 ± 0,45 <sup>cde</sup>
5	50,29 ± 0,09 <sup>ef</sup>	64,08 ± 0,10 <sup>de</sup>	83,08 ± 0,18 <sup>b</sup>	32,80	12,56 ± 0,30 <sup>fg</sup>
7	50,22 ± 0,37 <sup>ef</sup>	64,25 ± 0,20 <sup>d</sup>	82,94 ± 1,88 <sup>b</sup>	32,72	9,88 ± 0,46 <sup>h</sup>

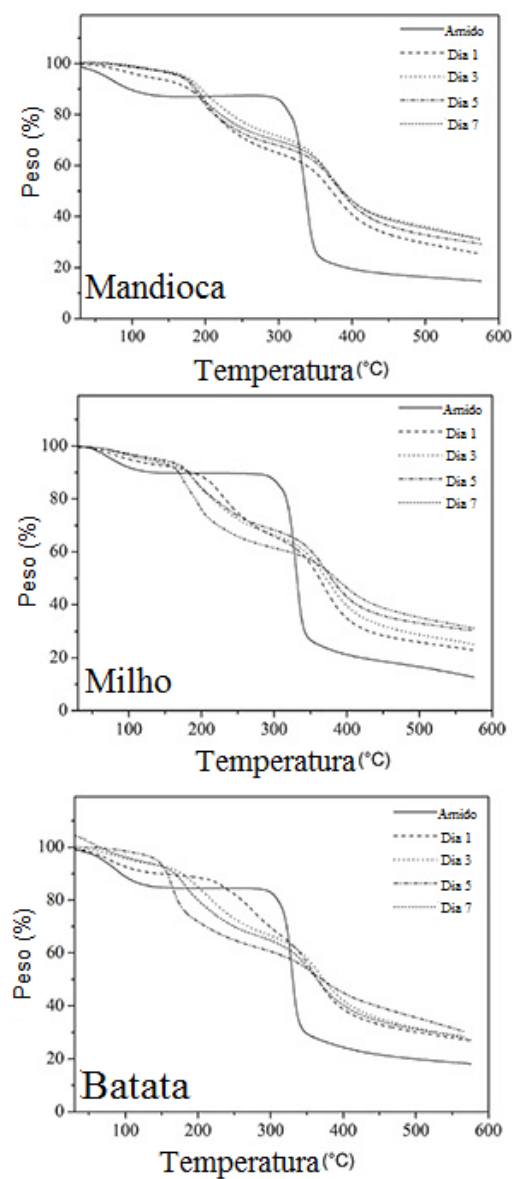
\*Média de três repetições seguida do desvio padrão. Valores seguidos da mesma letra na mesma coluna, para cada amido, não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ), T<sub>o</sub>, T<sub>p</sub>, T<sub>c</sub> = temperaturas iniciais, de pico e de conclusão; ΔT = (T<sub>c</sub> - T<sub>o</sub>), ΔH = variação de entalpia.

As amilodextrinas de batata apresentaram menor faixa de temperatura de fusão (ΔT), independente do tempo de hidrólise por causa da maior homogeneidade dos seus

cristais, enquanto as amilodextrinas de mandioca e milho tiveram uma maior tendência à aglomeração, como observado por FTIR-ATR.

### 3.2.5. Propriedades termogravimétricas

Independente da fonte botânica, os amidos e as amilodextrinas tiveram comportamento termogravimétrico similar com duas perdas de massa (Figura 7).



**Figura 7** – Análise termogravimétrica dos amidos e amilodextrinas de mandioca, milho e batata.

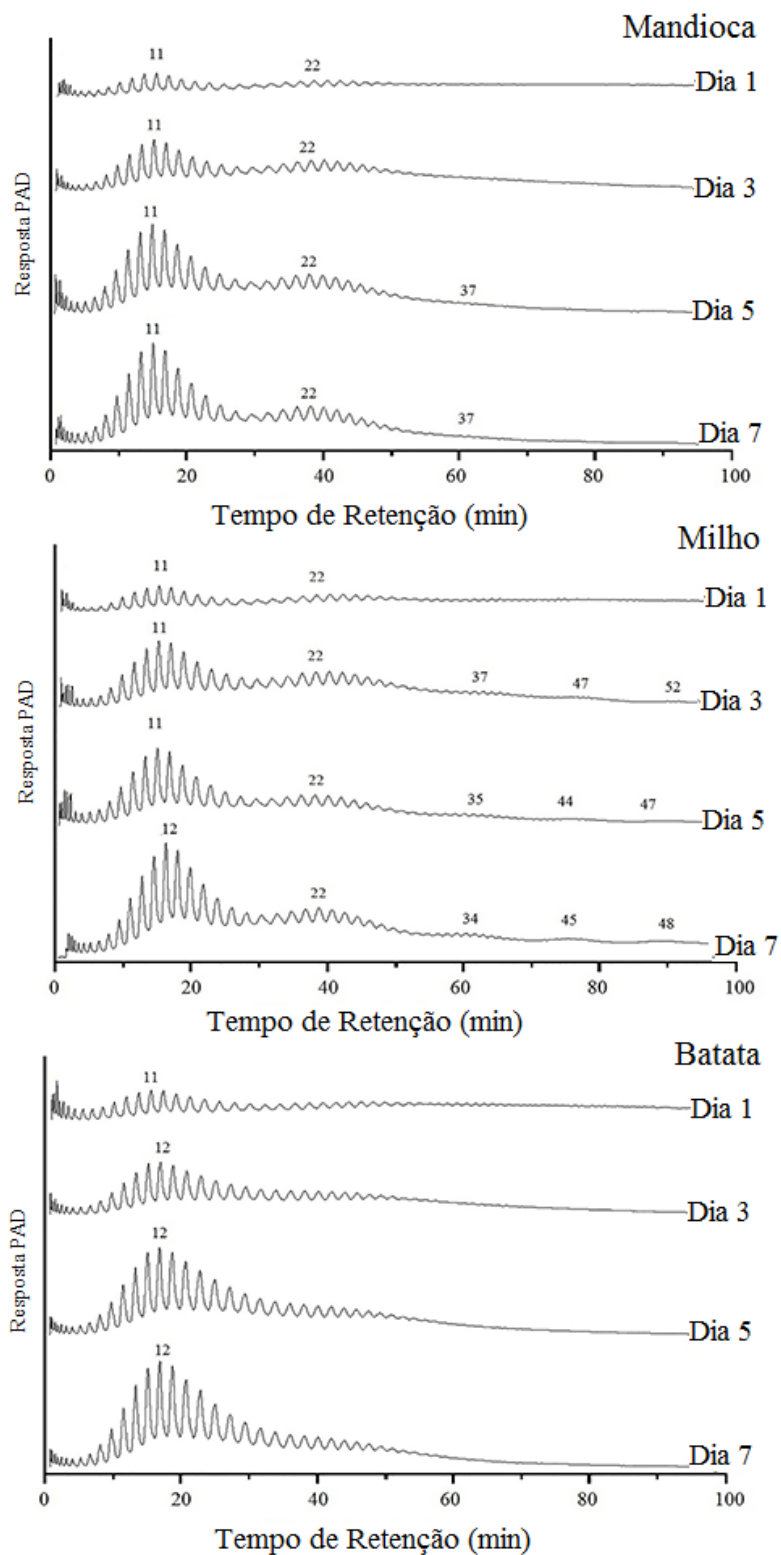
A primeira correspondeu ao processo de desidratação/evaporação da água (65 a 130 °C) e a segunda foi atribuída à decomposição das unidades glicosídicas dos amidos (265 a 404 °C) e das unidades glicosídicas das amilodextrinas (270 a 440 °C). A faixa de temperatura de decomposição das unidades glicosídicas das amilodextrinas foi levemente superior àquela dos amidos devido à maior energia requerida para decompor a fração cristalina remanescente. Além disso, uma terceira perda de massa nas temperaturas entre 150 e 250 °C foi observada nas amilodextrinas. A presença dos grupos sulfato na superfície das partículas causou despolimerização inicial do material. Estes resultados sugerem que as amilodextrinas podem ser aplicadas em condições de processo a altas temperaturas e baixa umidade. A massa final do resíduo foi maior nas amilodextrinas do que nos amidos devido à presença dos grupos sulfato nas partículas cristalinas levando ao aumento na quantidade de água liberada e à redução da combustão (ROMAN; WINTER, 2004).

### 3.2.6. Distribuição do comprimento de cadeias das amilodextrinas

Os cromatogramas de troca aniônica das amilodextrinas de mandioca, milho e batata obtidos após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise estão apresentados na Figura 8 e a relação entre as cadeias uniramificadas e cadeias lineares das amilodextrinas obtidas estão apresentadas na Tabela 5. Em geral, as amilodextrinas tinham cadeias com  $GP_{ap}$  2-51. Duas principais populações, com pico máximo no  $GP_{ap}$  11-12 e  $GP_{ap}$  22 que corresponderiam as cadeias lineares e uniramificadas (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; ROBIN et al., 1974; VERMEYLEN et al., 2004; KIM et al., 2012), respectivamente, foram observados, com exceção das amilodextrinas de batata que tem proporções muito menores de cadeias uniramificadas, representadas pelo ombro próximo ao  $GP_{ap}$  25.

O aumento da intensidade dos picos ( $GP_{ap}$  11-12 e  $GP_{ap}$  22) nas amilodextrinas de mandioca e milho e do ombro nas amilodextrinas de batata durante a hidrólise indica que as longas cadeias ramificadas dos amidos foram inicialmente degradados.





**Figura 8** – Cromatogramas HPAEC-PAD das amilodextrinas de mandioca, milho e batata obtidas a 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise.

**Tabela 5** – Relação entre as cadeias uniramificadas e cadeias lineares das amilodextrinas obtidas após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise

<b>Tempo de hidrólise (d)</b>	<b>P2/P1*</b>
Mandioca	
1	0,58
3	0,45
5	0,35
7	0,32
Milho	
1	0,69
3	0,50
5	0,35
7	0,35
Batata	
1	0,45
3	0,40
5	0,22
7	0,17

\*Relação entre as áreas do pico (P2)  $GP_{ap} \geq 18$  (cadeia uniramificada) e pico 1 (P1)  $GP_{ap} \leq 17$  (cadeias lineares) das amilodextrinas.

Os cromatogramas de amilodextrinas de mandioca exibiram um pico pequeno em  $GP_{ap}$  37 (Figura 8), que apareceu no quinto dia de hidrólise, enquanto que nas amilodextrinas de milho, pequenos picos adicionais próximos a  $GP_{ap}$  35, 44 e 47 (Figura 8) foram observados desde o terceiro dia do tratamento. Estes pequenos picos correspondem às cadeias ligadas aos pontos de ramificação, que eram resistentes à ação do ácido (VERMEYLEN et al., 2004). Parte das ligações ramificadas dos amidos com padrão tipo A (amido de mandioca e milho) estão dispersos nas lamelas cristalinas dos grânulos de amido, enquanto no padrão tipo B (amido de batata) eles são principalmente agrupados nas regiões amorfas. Nas regiões cristalinas, essas ligações são protegidas da

ação do ácido (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997). Essas cadeias contribuíram para o maior aumento da cristalinidade nas amilodextrinas do padrão tipo A (Tabela 3).

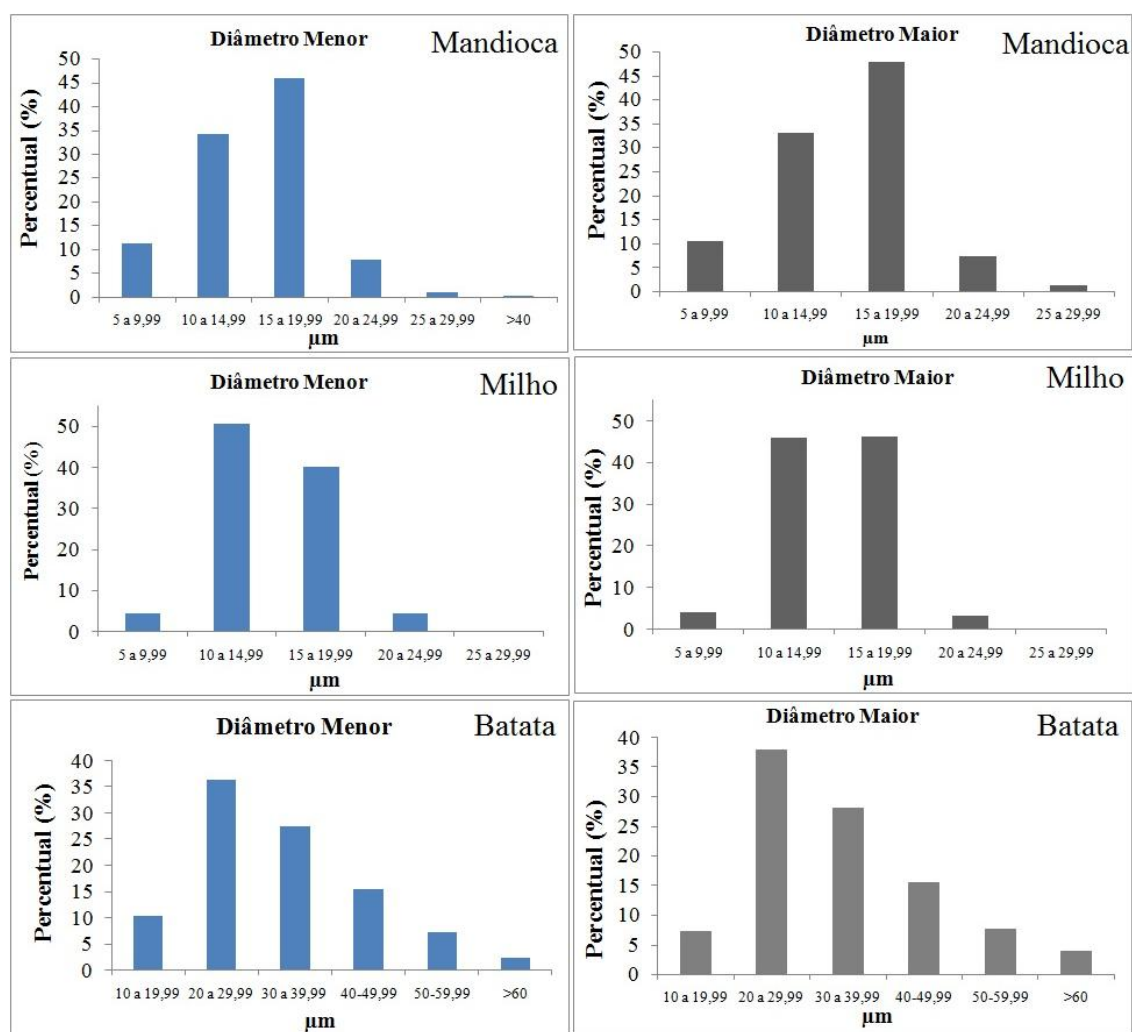
A relação entre as áreas das populações de cadeias uniramificadas e cadeias lineares (Tabela 5) foi maior nas amilodextrinas de milho seguida das amilodextrinas de mandioca e batata. Esses resultados confirmam o maior número de pontos de ramificação nas amilodextrinas do padrão tipo A.

### 3.2.7. Morfologia dos grânulos e distribuição do tamanho de grânulos de amido e amilodextrinas

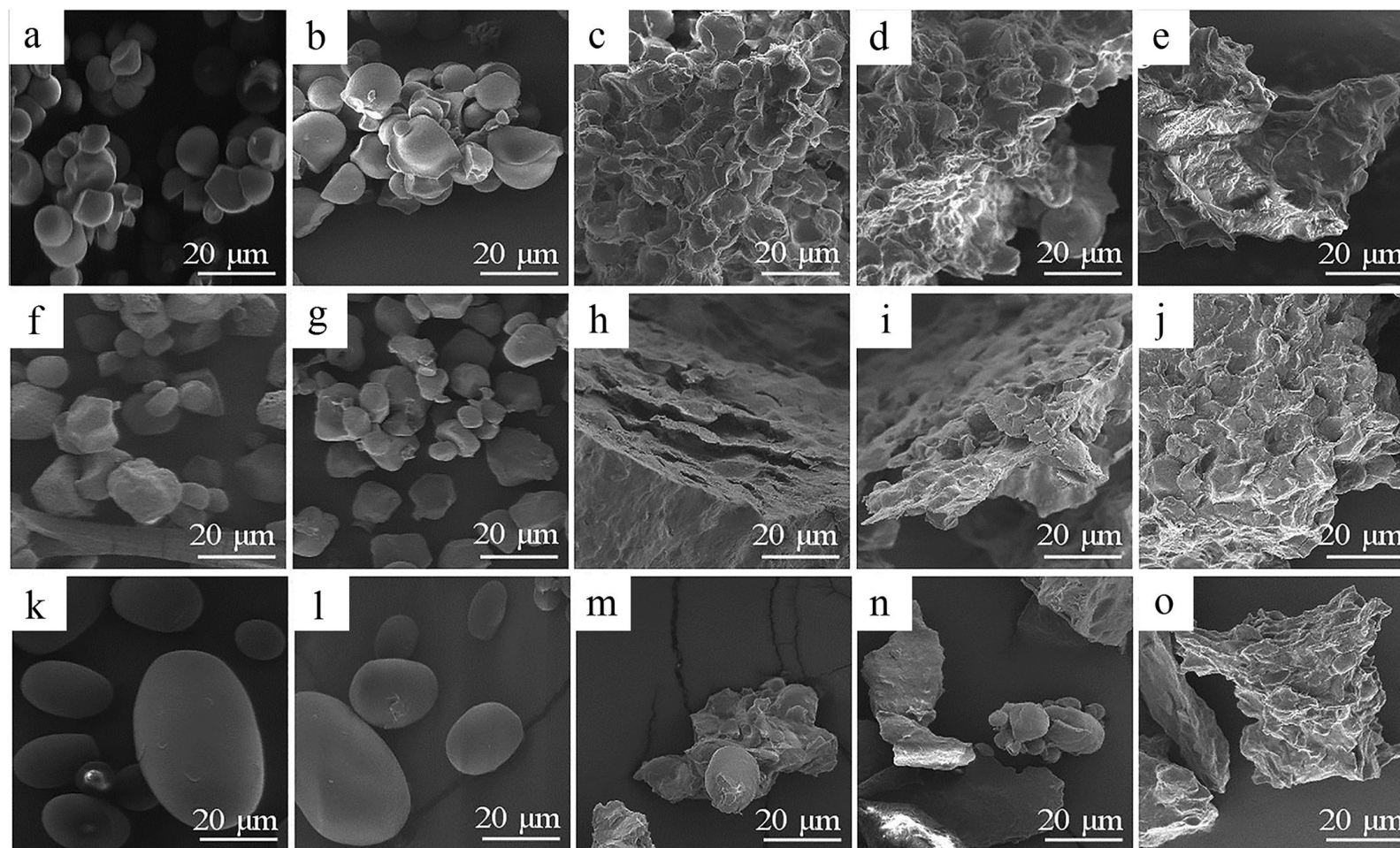
A forma e o tamanho dos grânulos de amido variaram consideravelmente entre as diferentes fontes botânicas. Os grânulos de amido de mandioca mostraram formato circular com extremidades truncadas e superfície lisa (Figura 10a), enquanto os grânulos de amido de milho exibiram formatos arredondados e poliédricos (Figura 10f). Alguns grânulos exibiram poros e depressões na sua superfície devido à alta atividade das enzimas amilases no estágio inicial da germinação dos grãos (FANNON; HAUBER; BEMILLER, 1992). Ambos os grânulos de amido de mandioca e milho tiveram distribuição de tamanho similar variando de 5 a 30  $\mu\text{m}$ , com diâmetro médio de 14,8  $\mu\text{m}$  (Figura 9). Os grânulos do amido de batata exibiram formato oval e elíptico, superfície lisa (Figura 10k), e tamanho variando de 10 a 60  $\mu\text{m}$ , com diâmetro médio de 32,7  $\mu\text{m}$  (Figura 9).

No primeiro dia de hidrólise, os amidos mantiveram sua estrutura granular (Figura 10b, 10g e 10l). Os grânulos de amidos de mandioca e batata mantiveram seu formato original, enquanto os grânulos de amido de milho exibiram pequenos pedaços como se tivessem se partido. Estruturas facetadas, características de materiais cristalinos, apareceram no terceiro dia de hidrólise nas amilodextrinas de mandioca e milho (Figura 10c e 10h) e somente no quinto dia de tratamento nas amilodextrinas de batata (Figura 10n). Esses resultados confirmam a maior resistência do amido com padrão tipo B no segundo estágio da hidrólise (Figura 3). Os grânulos de amido de mandioca e batata foram hidrolisados pela erosão ácida na sua superfície, enquanto os grânulos de amido de milho foram degradados pelo ácido pela difusão do ácido no

interior do grânulo devido sua estrutura porosa. Resultados semelhantes foram observados por Campanha e Franco (2011) e Fannon, Hauber e BeMiller (1992). Houve grande aglomeração de partículas em todas as amostras principalmente no ultimo dia de hidrólise (Figura 10d–e, 10i–j e 10n–o). Essa aglomeração de partículas pode estar relacionada com a maior quantidade de grupos hidroxilas livre nas amostras com o tempo de hidrólise. Esses grupos são capazes de formar ligações de hidrogênio entre si e favorecem a aglomeração (WEI et al., 2014a).



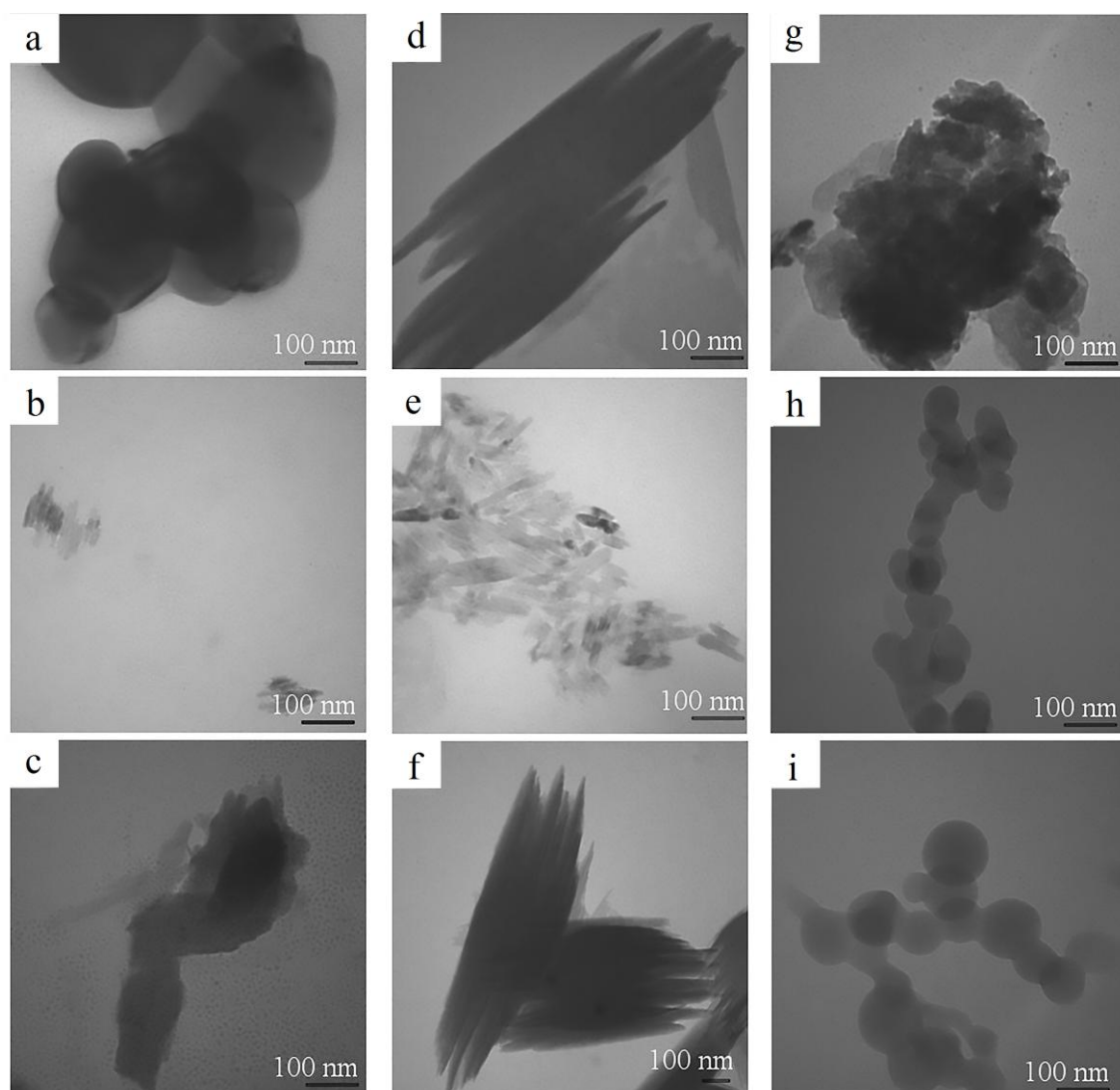
**Figura 9** – Distribuição do tamanho dos diâmetros maiores e menores de grânulos de amido de mandioca, milho e batata.



**Figura 10** – Micrografias dos amidos de mandioca (a), milho (f) e Batata (k). amilodextrinas de mandioca (b-e), milho (g-j) e batata (l-o) após 1, 3, 5 e 7 dias de hidrólise.

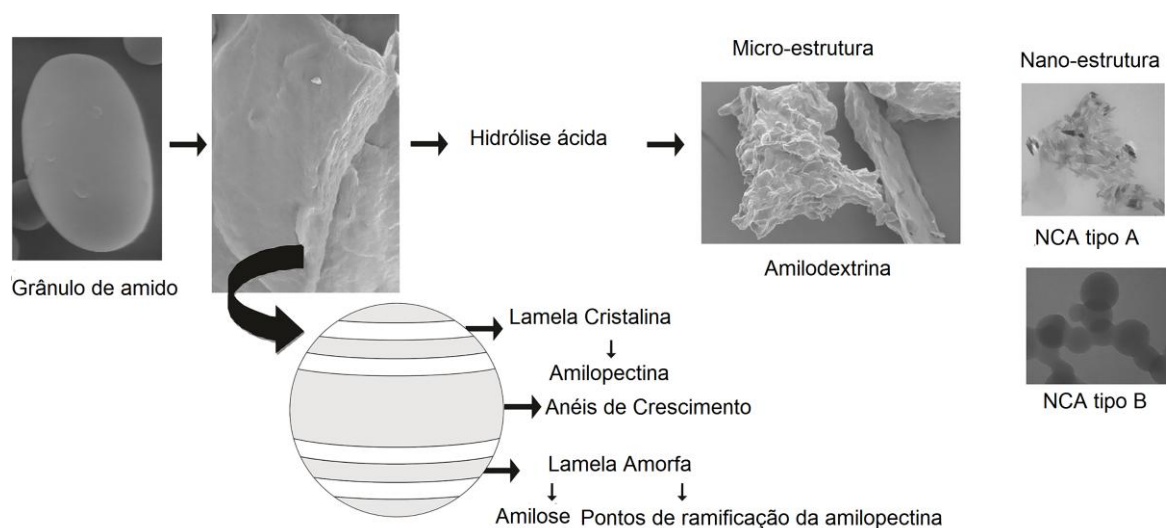
As amilodextrinas obtidas nos dias 3, 5 e 7 também foram estudadas utilizando microscópio eletrônico de transmissão (Figura 11). No terceiro dia de hidrólise, nanopartículas com tamanhos inferiores a 100 nm, nomeadas de nanocristais de amido (NCA), foram observadas apenas nas amilodextrinas de mandioca. Os NCA de mandioca tinham um formato quadrado e tamanho de 91,1 nm (Figura 11a). No mesmo período de tempo, as amilodextrinas de milho exibiram partículas com formato de plaquetas e tamanho de 505,14 nm de comprimento e 141,68 nm de largura (Figura 11d), enquanto as amilodextrinas de batata exibiam partículas aglomeradas com tamanhos micrométricos e nanométricos (Figura 11g). À medida que o tempo de hidrólise aumentou, todas as amilodextrinas apresentaram NCA com formatos bem definidos. Os NCA de mandioca e milho (Figura 11b e 11e) exibiram formato de plaqueta, enquanto os NCA de batata exibiram formatos redondos (Figura 11h). A forma dos NCA foi relacionada aos padrões tipo A e B de suas amilodextrinas. No padrão tipo A, o cristalito exibe um arranjo ortorrômbico, enquanto no tipo B o arranjo é hexagonal. Estes resultados foram próximos àqueles observados por Putaux et al. (2003), Angellier-Coussy et al. (2009) e LeCorre, Bras e Dufresne (2011). Por outro lado, Kim et al. (2012) observaram formatos arredondados e ovais para os NCA, independente do padrão cristalino do amido.

O tamanho dos NCA também diminuiu no quinto dia de tratamento. Os NCA de mandioca mediram 59,32 nm de comprimento e 10,74 nm de largura, enquanto os NCA de milho tinham 67,32 nm de comprimento e 14,32 nm de largura. NCA de batata tiveram diâmetro de 67,25 nm. A morfologia e o tamanho dos NCA podem definir seu uso em aplicações industriais como, por exemplo, como estabilizador de emulsão, substituto de gordura ou reforçador mecânico de qualquer matriz polimérica, tornando o padrão cristalino e o tempo de hidrólise parâmetros importante para serem considerados na produção de NCA. Embora a forma dos NCA não tenha alterado, uma intensa aglomeração de partículas ocorreu no último dia de hidrólise, o que resultou em NCA com tamanhos maiores (Figura 11c, 11f e 11i). Este comportamento provavelmente ocorreu devido à maior quantidade de grupos hidroxilas livres na superfície das amilodextrinas como discutido anteriormente.



**Figura 11** – Micrografias de MET dos nanocristais de mandioca (a-c), milho (d-f) e batata (g-i) após 3, 5 e 7 dias de hidrólise.

Assim, a partir dos resultados de MEV e MET, foi possível observar duas estruturas, micro- e nano-, em todas as amilodextrinas (Figuras 12). As micro-estruturas provêm das partículas cristalinas aglomeradas de amilodextrinas, que têm formas facetadas, enquanto as nano-estruturas estão relacionadas com a organização das hélices duplas nas lamelas cristalinas.



**Figura 12** – Micro- e nano-estruturas das amilodextrinas com padrão tipo A e B.

#### 4. CONCLUSÃO

Os amidos de mandioca, milho e batata apresentaram comportamentos diferentes durante a hidrólise ácida devido às suas características estruturais. As amilodextrinas de mandioca apresentaram NCA desde o terceiro dia de hidrólise, enquanto as amilodextrinas de batata e milho apresentaram NCA apenas no quinto dia. O arranjo das duplas hélices dos padrões cristalinos de tipo A e B influenciou as taxas de hidrólise e a morfologia dos NCA. Este estudo mostrou que os NCA tipo A (amidos de mandioca e milho) tinham forma de plaquetas e eram estrutural e termicamente mais estáveis do que o padrão tipo B que eram redondos. O amido de mandioca mostrou ser um material promissor para a produção de NCA, uma vez que 3 dias de hidrólise foram suficientes para obter cristais mais estáveis em escala nanométrica.

#### 5. REFERÊNCIAS

AACC - Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 7 ed., 2 v., St, Paul, Minnesota, 2000.

ANGELLIER-COUSSY, H.; PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S. N.; DUFRESNE, A.; BERTOFT, E.; PEREZ, S. The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1558–1566, 2009.



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

CAMPANHA, R. B. **Características físico-químicas e estruturais de amidos nativos e suas dextrinas Naegeli**. 79f. (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

CAMPANHA, R. B.; FRANCO, C. L. M. Gelatinization properties of native starches and their Naëgeli dextrins. **Journal Thermal Analyses Calorimeter**, v. 106, n. 3, 799–804, 2011.

CHAROENKUL, N.; UTTAPAP, D.; PATHIPANAWAT, W.; TAKEDA, Y. Physicochemical characteristics of starches and flours from cassava varieties having different cooked root textures. **LWT—Food Science Technology**, v. 44, p. 1774–1781, 2011.

CHUNG, H-J; LI, X-Q; KALINGA, Q.; LIM, S-T; YADA, R.; LIU, Q. Physicochemical properties of dry matter and isolated starch from potatoes grown in different locations in Canada. **Food Research International**, v. 57, p. 89–94, 2014.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527–1534, 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de alimentos de Fennema. IN: BEMILLER, J.; HUBER, K. C. **Carboidratos**. Ed. Artmed, 4 ed., 2010. p. 75–130.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. R.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–354, 1956.

ECKHOFF, S. R.; RAUSCH, K. D.; FOZ, E. J.; TSO, C. C.; WU, X.; PAN, Z.; BURIK, P. A laboratory wet-milling procedure to increase reproducibility and accuracy of product yields. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 723–727, 1993.

FANNON, J. E.; HAUBER, R. J.; BEMILLER, J. N. Surface pores of starch granules. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 284–288, 1992.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microplate plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n.1, p. 93–96, 1991.

FRANCO, C. M. L.; WONG, K.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, n. 79, n. 2, p. 243–248, 2002.

FRANG, J. M.; FOWLER, P. A.; TOMKINSON, J.; HILL, C. A. S. The preparation and characterization of a series of chemically modified potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 245–252, 2002.

GENKINA, N. K.; WIKMAN, J.; BERTOFT, E.; YURYEV, P. Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2329–2335, 2007.

GOLDSTEIN, A.; ANNOR, G.; PUTAUX, J.-L.; HEBELSTRUP, K. H.; BLENNOW, A.; BERTOFT, E. Impact of full range of amylose contents on the architecture of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 305–318, 2016.

HAAJA, S. B.; THIELEMANS, H.; MAGNIN, A.; BOUFI, S. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maizeas nanoreinforcement: A comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 310–317, 2016.

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

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

IMBERTY, A.; PEREZ, S. Conformational analysis and molecular modelling of the branching point of amylopectin. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 11, p. 177–185, 1989.

JANE, J. L.; WONG, K. S.; MCPHERSON, A. E. Branch-structure difference in starches of A- and B-type Xray patterns revealed by their Naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 300, p. 219–227, 1997.

JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effect of amylopectin branch length and amylase content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 665–680, 1999.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205–213, 2006.

JIANG, H.; SRICHUWONG, S.; CAMPBELL, M.; JANE, J. Characterization of maize amylose extender (*ae*) mutant starches. Part III: Structures and properties of the Naegeli dextrins. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, 885–891, 2010.

JIVAN, M. J.; MADADLOU, A.; YARMAND, M. An attempt to cast light into starch nanocrystals preparation and cross-linking. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1661–1666, 2013.

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 and starch phospholipids by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.73, n.6, p. 702–707, 1996.

KIM, K.; LEE, J. H.; KIM, J. Y.; LIM, W. J.; LIM, S. T. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch/Stärke**, v.64, p. 367–373, 2012.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of starch's properties on starch nanocrystal thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 658–666, 2012.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 7193–7208, 2011.

LI, W.; CORKE, H.; BETA, T. Kinetics of hydrolysis and changes in amylase content during preparation of microcrystalline starch from high-amylose maize starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 398–405, 2007.

LIM, S.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Characterization of phosphorus in starch by  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.71, p. 488–493, 1994.

MIAO, M.; JIANG, B.; ZHANG, T.; JIN, Z.; MU, Z. Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. **Food Chemistry**, v. 126, p. 506–513, 2011.

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

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Stärke**, v. 35, n. 12, p. 407–410, 1983.

PEREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Starch chemistry and technology. In **Structural features of starch granules I**. BEMILLER, J.; WHISTLER, R. Eds. Elsevier:New York, 2009, pp.149–188.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science Technology International**, v. 12, n. 5, p. 505–513, 2006.

PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; MOMAUR, T.; DUFRESNE, A. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1198–1202, 2003.

ROBIN, J. P.; MERCIER, M.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starch gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, 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 on its semicrystalline structure. **Journal Agricultural Food Chemistry** v. 59, p. 4208–4216, 2011.

ROCHA, T. S. FELIZARDO, S. G., JANE, J., FRANCO, C. M. L. Effect of annealing on the semicrystalline structure of normal and waxycorn starches. **Food Hydrocolloids** v. 29, p. 93–99, 2012.

ROJAS, J. A., ROSELL, C. M., BENEDITO, C. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 27–33, 1999.

ROLLAND-SABATÉ, A.; SÁNCHEZ, T.; BULÉON, A.; COLONNA, P.; JAILLAIS, B.; CEBALLOS, H.; DUFOUR, D. Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 161–174, 2012.

ROMAN, M.; WINTER, W.T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, n. 5, p. 1671–1677, 2004.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L. SINGH, N. S.; SINGH, B. G. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

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.

SRICHUWONG, S.; ISONO, N.; MISHIMA, T.; HISAMATSU, M. Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to acid and enzyme hydrolysis of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 115–121, 2005.

STASOFT. **STATISTICA 7.0 for Windows** – Computar program manual. Tulsa: Statsoft, Inc., 2007. CD Room.

TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S.; JULIANO, O. Structures of rices amylopectins with low and high affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v. 37, p. 79–88, 1987.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551–557, 1990.

TESTER, R. F. Properties of damaged starch granules: composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 3, p. 293–301, 1997.

TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; DAVIES, H. V.; GIDLEY, M. J. Effect of temperature on the synthesis, composition and physical properties of potato starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 2045–2051, 1999.

UTRILLA-COELLO, G.; HERNÁNDEZ-JAIMES, C.; CARRILLO-NAVAS, H.; GONZÁLEZ, F.; RODRÍGUEZ, F.; BELLO-PÉREZ, L. A.; VERNON-CARTER, E. J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 596–602, 2014.

VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; REYNAERS, B.; DELCOUR, J. A. Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1775–1786, 2004.

WANG, S.; YU, J.; YU, J. Conformation and location of amorphous and semi-crystalline regions in C-type starch granules, revealed by SEM, NMR and XRD. **Food Chemistry**, v. 110, p. 39–46, 2008.

WANG, S.; JINGLIN, Y.; JIUGAO, Y.; JIPING, P.; HONGYAN, L. Structure characterization of C-type starch granule by acid hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1283–1290, 2008.

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.

WEI, B.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Surface chemical composition and dispersion of starch of nanocrystals formed by acid sulfuric and hydrochloric acid. **Plos One**, v. 9, 2014a.

WEI, B.; HU, X.; LI, H.; WU, C. XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Effect of pHs on dispersity of maize starch nanocrystals in aqueous médium. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 369–373, 2014b.

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, p. 63–80, 1995.

YOO, S. H.; PERERA, C.; SHEN, J.; YE, L.; SUH, D. S.; JANE, J. Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1556–1564, 2009.

# Capítulo III

*Diferentes padrões cristalinos influenciam a organização molecular de nanocristais de amido*

## RESUMO

Nanocristais de amido (NCA) são obtidos pela extensiva hidrólise ácida dos seus grânulos a temperaturas inferiores à temperatura de gelatinização do amido. O objetivo deste estudo foi determinar a estrutura molecular de NCA com padrões cristalinos tipos A e B. NCA de mandioca e de milho (tipos A), e de batata (tipo B) obtidos após cinco dias de hidrólise com  $H_2SO_4$  foram fracionados em colunas de Bio-Gel P6. Frações de alto ( $GP_{ap} \geq 24$ ) e baixo peso molecular ( $GP_{ap}$  9-23) obtidas foram submetidas a diferentes tratamentos enzimáticos (a:  $\beta$ -amilase seguido de isoamilase e pululanase; b: enzimas desramificantes seguido de  $\beta$ -amilase) e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada. Os NCA, independente do padrão cristalino, eram constituídos de duplas hélices estáveis formadas por cadeias com grau de polimerização entre 10 e 15, porém com características distintas: enquanto os NCA tipo A continham maior quantidade de ramificações localizadas principalmente na extremidade redutora de sua estrutura, os NCA tipo B tinham menos ramificações, as quais estavam localizadas na extremidade não-redutora. Os NCA de milho continham cadeias internas mais longas, as quais ficaram protegidas do ácido pelos pontos de ramificação. A localização dos pontos de ramificação na estrutura cristalina influenciou o formato dos NCA que se mostraram arredondados nos tipo B e com formato de plaquetas nos tipo A.

**Palavras-chave:** nanopartículas de amido, tratamento enzimático, organização das duplas hélices, morfologia

## 1. INTRODUÇÃO

O amido é um homopolissacarídeo composto por unidades de  $\alpha$ -D-glicose. Duas principais macromoléculas, amilose e amilopectina, organizadas em camadas semicristalinas, compõem os grânulos de amido. A amilose é formada por resíduos de glicose ligados em  $\alpha$ -(1,4), enquanto a amilopectina, molécula altamente ramificada, consiste de cadeias curtas formadas por ligações  $\alpha$ -(1,4) interligadas às demais cadeias



por ligações  $\alpha$ -(1,6) (BULÉON et al., 1998). A amilose e os pontos de ramificação da amilopectina fazem parte das regiões amorfas, enquanto as cadeias ramificadas da amilopectina formam as regiões cristalinas do grânulo (COPELAND et al., 2009).

A molécula de amilopectina consiste de cadeias ramificadas denominadas de cadeias A e B e uma cadeia principal denominada C. As cadeias A ficam nas regiões mais externas da molécula interligadas às cadeias B e C, mas não carregam qualquer ramificação, enquanto as cadeias B estão ligadas por pontos de ramificação  $\alpha$ -(1,6) em mais de uma cadeia A ou B (B1-B4). A cadeia C carrega o grupo redutor da molécula (ROBIN et al., 1974; TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

O modelo mais aceito para a estrutura da amilopectina é o de *clusters*, sendo que cada *cluster* seria formado pela associação de 2 ou 3 cadeias A ou B. Neste modelo foi proposto que os pontos de ramificação estão localizados entre os *clusters*, numa região mais amorfa, enquanto as cadeias ramificadas, empacotadas na forma de duplas hélices formam as regiões cristalinas do grânulo (FRENCH, 1972, BALL et. al., 1996). As cadeias longas da amilopectina podem estar interligadas a dois ou mais *clusters* e assim apresentam uma distribuição polimodal com picos periódicos de diferentes comprimentos entre dois *clusters* adjacentes (ROBIN et al., 1974; HIZUKURI, 1986). No grânulo de amido, as duplas hélices de amilopectina cristalizam em dois principais padrões denominados tipos A e B. No arranjo tipo A as duplas hélices estão densamente empacotadas em uma célula unitária monoclinica (grupo espacial B2) contendo 8 moléculas de água em seu interior, enquanto no tipo B as duplas hélices se empacotam em uma célula unitária hexagonal (grupo espacial P6<sub>1</sub>) com 36 moléculas de água na cavidade central (IMBERTY et al., 1991; BULÉON et al., 1998). O comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina e o empacotamento das duplas hélices determinam o tipo de padrão cristalino e a cristalinidade do amido. No tipo A predominam as cadeias ramificadas curtas, enquanto no tipo B ocorre uma maior proporção de cadeias ramificadas longas interligadas a dois ou mais *clusters* (HIZUKURI, 1986; JANE, 2006). Um padrão denominado tipo C também pode ser observado nos amidos, sendo ele formado pela combinação das estruturas A e B (JANE, 2006).

A hidrólise ácida possibilita estudar melhor a arquitetura cristalina dos grânulos de amido. Durante a hidrólise, as áreas amorfas dos grânulos são degradadas, enquanto

as estruturas cristalinas, resistentes ao ácido, são preservadas. Os cristais obtidos após extensiva hidrólise (HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dos grânulos são denominados nanocristais de amido (NCA) (PUTAUX et al., 2003; ANGELLIER et al., 2004; ANGELLIER-COUSSY et al., 2009; LECORRE; BRAS; DUFRENES, 2012) e representam a estrutura molecular das lamelas cristalinas, sendo estas estruturas compostas por duas extremidades distintas, uma redutora e outra não-redutora (WIKMAN; BLENNOW; BERTOFT, 2013).

Para Kim, Park e Lim (2015), os NCA representam os bloquetes dos grânulos de amido e as diferenças no arranjo das duplas hélices de amilopectina (padrões tipo A e B) nas lamelas cristalinas podem induzir à formação de bloquetes com tamanhos e formatos diferentes. Putaux et al. (2003) foram os primeiros a observar a morfologia dos NCA e verificaram que as nanopartículas de amido de milho ceroso tinham formato de plaquetas, semelhante à organização dos alomorfos tipo A. LeCorre, Bras e Dufresne (2011) também observaram que a morfologia dos NCA estava relacionada com o padrão cristalino quando analisaram NCA de diferentes origens (batata, trigo e milho normal, ceroso e com alto teor de amilose). No entanto, Kim et al. (2012), trabalhando com nanopartículas obtidas de amidos com diferentes padrões cristalinos (A, B e C), reportaram que independente do padrão cristalino, os NCA apresentam formatos arredondados e ovais. As características morfológicas das amilodextrinas com diferentes padrões cristalinos, obtidas, caracterizadas e apresentadas no Capítulo II desta tese, evidenciaram que as mesmas eram formadas por estruturas com escalas micro- e nano-. As nano-estruturas foram relacionadas com a organização das duplas hélices nas lamelas cristalinas, assim os NCA tipo A e B exibiram formatos de plaquetas e arredondados, respectivamente.

A estrutura molecular dos resíduos cristalinos (NCA) obtidos após a hidrólise depende da composição e organização dos grânulos de amido, além da taxa de hidrólise. Muitos estudos de distribuição do tamanho das cadeias desses resíduos cristalinos têm sido publicados. Esses estudos têm mostrado que as dextrinas que compõem essas frações cristalinas são principalmente lineares, com grau de polimerização (GP) de 11 a 17, e uniramificadas (GP 22-30). Além dessas cadeias, são também observadas dextrinas com múltiplas ramificações (GP > 35) (ROBIN et al., 1974; BILIADERIS et al., 1981;

JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; VERMEYLEN et al., 2004; SRICHUWONG et al., 2005; YOO et al., 2009; ANGELLIER-COUSSY et al., 2009; JIANG et al., 2010; MIAO et al., 2011; KIM et al., 2012).

Angellier-Coussy et al. (2009), estudando NCA de milho ceroso observaram que os mesmos eram compostos por oito tipos de dextrinas, sendo que mais da metade delas eram uniramificadas e os pontos de ramificação se encontravam principalmente nas suas extremidades reductoras. A influência do tempo/temperatura de hidrólise e a interferência da amilose na estrutura molecular de resíduos lintnerizados (amidos hidrolisados com HCl) ou de amilodextrinas Näegeli (amidos hidrolisados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) também tem sido avaliados (BERTOFT, 2004; WIKMAN; BLENNOW; BERTOFT, 2013; WIKMAN et al., 2013; GOLDSTEIN et al., 2016). Estes trabalhos mostraram que o teor de amilose tem um efeito significativo na estrutura molecular dos resíduos cristalinos, pois a mesma retarda as taxas de hidrólise e reduz a quantidade de duplas hélices na estrutura cristalina.

Assim, a maioria dos trabalhos tem focado em amidos com diferenças significativas no teor de amilose e nas diferentes condições de hidrólise a que eles são submetidos, mas poucos têm levado em consideração amidos regulares com teores de amilose semelhante, mas diferentes padrões cristalinos. O presente estudo teve por objetivo estudar as estruturas moleculares dos NCA com diferentes padrões cristalinos (A e B) e sua influencia na morfologia dos mesmos. Para este estudo foram utilizados amidos regulares de mandioca, milho e batata, os quais apresentam diferentes padrões cristalinos, A e B, respectivamente.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

Amidos de batata (cultivar IAC Ibituaçu), mandioca (cultivar Cascudinha) e milho (cultivar IPR 114) previamente isolados como descrito no Capítulo II foram utilizados. As enzimas isoamilase de *Pseudomonas sp* (EC 3.2.1.68), pululanase de *Klebsiella planticola* (EC 3.2.1.41) e  $\beta$ -amilase de cevada (EC 3.2.1.2) com atividades

de aproximadamente 260 U/mg, 34 U/mg e 42 U/mg, respectivamente, foram obtidas da Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Irlanda). As atividades específicas de cada enzima foram dadas pelo fornecedor. Todos os reagentes utilizados foram puros para análise.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Obtenção dos nanocristais de amido

Amidos de batata, mandioca e milho (14,8%, m/v) foram hidrolisados com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3,16 M durante 5 dias a 40 °C com agitação constante de 100 rpm (ANGELLIER-COUSSY et al., 2009). Os resíduos obtidos após liofilização foram denominados de nanocristais de amido (NCA).

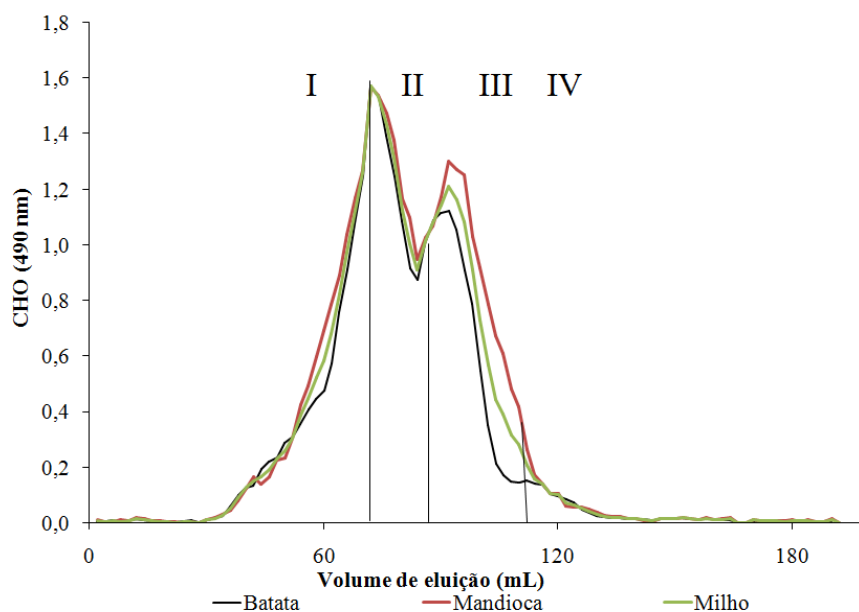
### 2.2.2. Distribuição das cadeias dos NCA determinada por HPAEC-PAD

A distribuição do comprimento das cadeias dos NCA foi analisada por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) usando um sistema ICS 3000 (Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Os NCA (1 mg) foram dispersos em 1 mL de água ultra-pura (18 M $\Omega$ .cm), colocados em banho de água fervente por 15 min, resfriados e filtrados (0,22  $\mu\text{m}$  membrana). Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das soluções foram automaticamente injetadas no sistema. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min e temperatura de 40 °C. O eluente A foi composto de 200 mM de hidróxido de sódio e o eluente B de 100 mM de hidróxido de sódio e 1000 mM de acetato de sódio. Os eluentes foram preparados com água ultra-pura (18 M $\Omega$ .cm) e degaseificados com  $\text{N}_2$ . As cadeias de NCA foram separadas usando uma guarda coluna Dionex CarboPac™ PA-100 (4 mm x 50 mm) em combinação com uma coluna de troca aniônica Dionex CarboPac™ PA-100 (4 mm x 250 mm). O gradiente ótimo foi baseado no método de Koch, Andersson e Åman (1998) como descrito a seguir: 0 - 15 min, gradiente linear de 140 a 200 mM de acetato de sódio e constante de 150 mM de hidróxido de sódio; 15 - 95 min, gradiente linear de

200 a 360 mM de acetato de sódio e constante de 150 mM de hidróxido de sódio; 95 - 110 min, gradiente linear 360 a 500 mM de acetato de sódio e 150 a 50 mM de hidróxido de sódio; 110 - 125 min, gradiente linear finalizando em 140 mM de acetato de sódio e 150 mM de hidróxido de sódio. Misturas de maltodextrinas (GP1-GP7) contendo diferentes concentrações (31, 42, 23, 42, 39, 33 e 48  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) de cada açúcar foram utilizadas para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. O “grau de polimerização aparente” ( $\text{GP}_{\text{ap}}$ ) das estruturas ramificadas dos NCA (cadeias sem tratamento de enzimas desramificantes) foi determinado (VERMEYLEN et al., 2004). Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

### 2.2.3. Distribuição dos componentes moleculares dos NCA por cromatografia de permeação em gel (GPC)

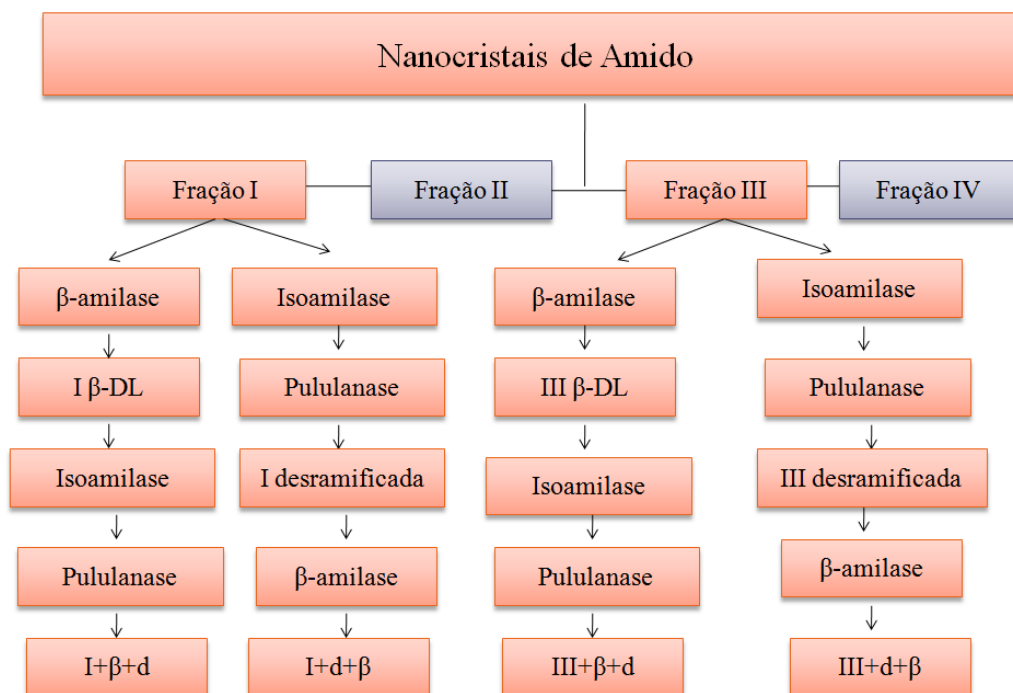
A distribuição de tamanho molecular dos componentes dos NCA de batata, mandioca e milho foi determinada por GPC seguindo o procedimento descrito por Angellier-Coussy et al. (2009), com modificações. Uma suspensão (25 mg de NCA e 5 mL de água deionizada) foi colocada em banho de água fervente por 5 min, resfriada e filtrada em membrana de teflon de 0,22  $\mu\text{m}$ . Alíquota de 4,9 mL da amostra foi aplicada no topo da coluna (90 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro) empacotada com Bio-Gel P-6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA). A eluição com água deionizada ocorreu de forma descendente, com fluxo de 0,4 mL/min. Frações de 2,0 mL foram coletadas a cada 5 min e analisadas quanto ao teor de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O material coletado foi reunido em quatro frações (I, II, III, e IV, Figura 1) de acordo com Angellier-Coussy et al. (2009) e então liofilizadas para posterior estudo enzimático.



**Figura 1** – Perfis de eluição dos NCA de batata, mandioca e milho obtidos por cromatografia de permeação em Bio-Gel P6.

#### 2.2.4. Tratamento enzimático das frações obtidas por GPC

O estudo enzimático foi realizado de acordo com Angellier-Coussy et al. (2009) com pequenas modificações, usando as frações I e III obtidas como descrito no item 2.2.3, seguindo o fluxograma apresentado na Figura 2. Soluções aquosas das frações I e III (2 mg/mL) foram preparadas e tratadas como segue:



**Figura 2** – Esquema dos tratamentos enzimáticos das frações I e III dos NCA.

I β-DL e III β-DL: frações I e III de β-dextrinas limites obtidas após a ação da β-amilase; I+β+d e III+β+d: frações I e III tratadas com β-amilase seguida da desramificação; I+d+β e III+d+β: frações I e III desramificadas tratadas com β-amilase.

A: Amostras tratadas com β-amilase: Alíquotas de 0,45 mL das frações I e III foram misturadas a 50 μL de tampão acetato de sódio 0,01 M (pH= 6,0) e 4 U β-amilase/mg de amostra e incubadas a 25 °C por 12 h. A mistura foi então aquecida em banho de água fervente por 5 min para interromper a reação.

B: Amostras tratadas com β-amilase seguidas da desramificação: Alíquotas (0,5 mL) das misturas obtidas em A (frações I e III tratadas com β-amilase) foram misturadas a 25 μL de tampão acetato de sódio 0,01 M (pH= 3,5) e 0,55 μL de isoamilase e incubadas a 25 °C por 12 h. A enzima foi inativada em banho de água fervente por 5 min e à mistura foi adicionado 0,5 mL de água, 0,1 mL de acetato de sódio 0,1 M (pH= 5,5) e 1,20 μL de pululanase. A mistura foi novamente incubada a 25 °C por 12 h e então aquecida em banho de água fervente por 5 min para interromper a reação.

C: Amostras desramificadas: Alíquotas de 0,48 mL das frações I e III foram misturadas a 25 µL de tampão acetato de sódio 0,01 M (pH= 3,5) e 0,55 µL de isoamilase e incubadas a 25 °C por 12 h. A enzima foi inativada em banho de água fervente por 5 min e à mistura foi adicionado 0,5 mL de água, 0,1 mL de acetato de sódio 0,1 M (pH= 5,5) e 1,20 µL de pululanase. A mistura foi novamente incubada a 25 °C por 12 h e então aquecida em banho de água fervente por 5 min para interromper a reação.

D: Amostras desramificadas e tratadas com β-amilase: Alíquotas de 0,3 mL das misturas obtidas em C (frações I e III desramificadas) foram misturadas a 0,3 mL de acetato de sódio 0,1 M (pH= 6,5) e 4 U β-amilase/mg de amostra. As amostras foram incubadas a 25 °C por 12 h e então aquecidas em banho de água fervente por 5 min para interromper a reação.

#### 2.2.4.1. Composição das frações I e III antes e após tratamentos enzimáticos determinada por HPAEC-PAD

A composição das frações I e III antes e após a ação das enzimas foi analisada por HPAEC-PAD, usando o sistema ICS 3000 (Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Alíquotas de 20 µL das amostras foram automaticamente injetadas no sistema. Os parâmetros instrumentais foram os mesmos que os descritos no item 2.2.2. O “grau de polimerização aparente” ( $GP_{ap}$ ) das estruturas ramificadas dos NCA (cadeias sem tratamento de enzimas desramificantes) e o grau de polimerização (GP) das cadeias lineares (amostras desramificadas com isoamilase e pululanase) foram determinados (VERMEYLEN et al., 2004). Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

A concentração molar relativa das cadeias, expressa em mol % e  $\overline{GP}$  foram calculados a partir da equação 1 e 2, respectivamente.

$$\text{Concentração molar relativa (mol\%)} = [(c_i/GP_i)/\sum(c_i/GP_i) \times 100] \quad (1)$$

$$\overline{GP} \text{ ou } \overline{GP}_{ap} = [\sum c_i / \sum (c_i/GP_i)] \quad (2)$$



Onde  $c_i$  é a concentração de carboidrato normalizada e  $GP_i$  é o GP do pico  $i$  (BERTOFT et al., 2008).

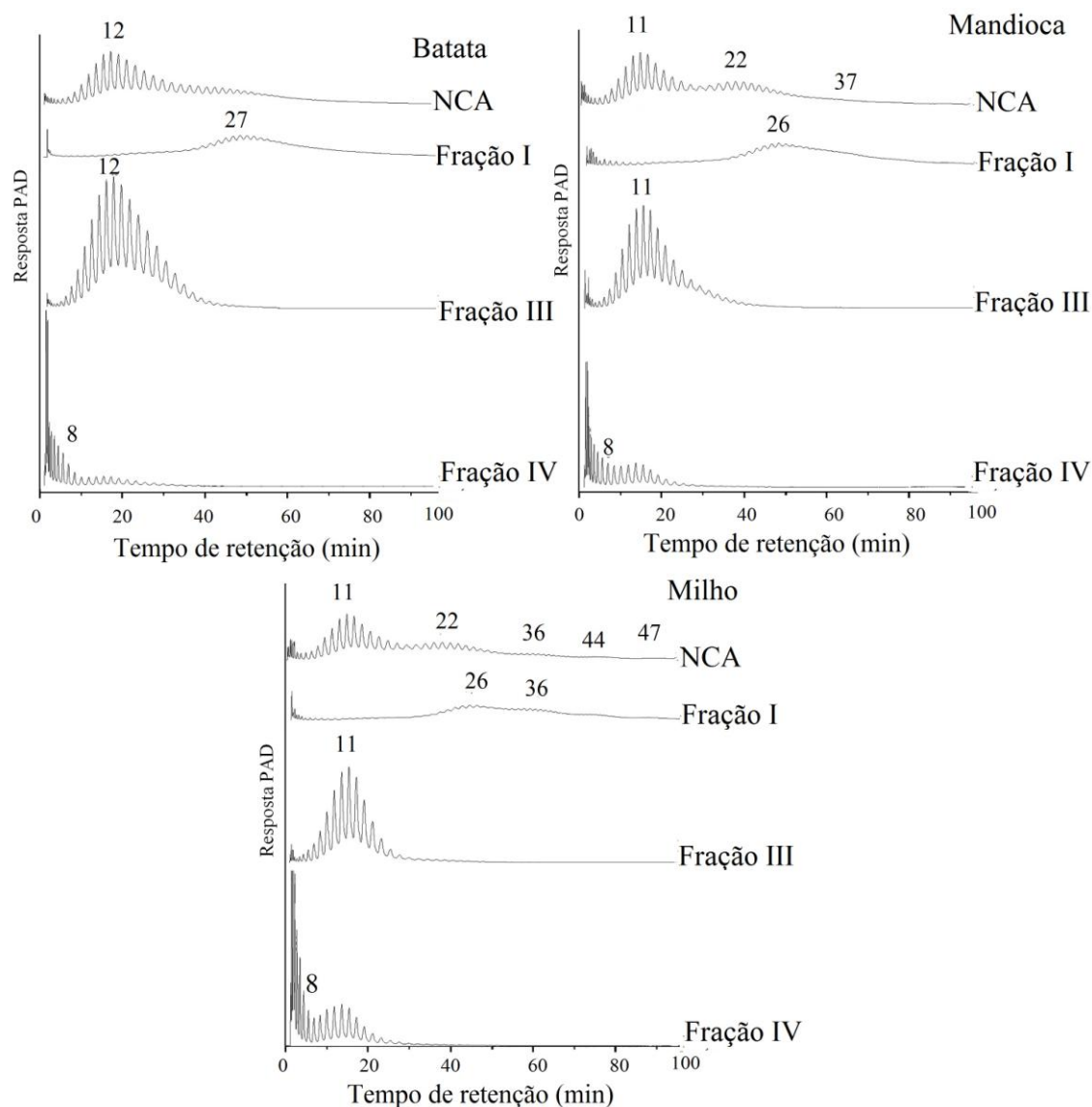
O número médio aparente de cadeias por molécula (NC) foi calculado pela razão entre  $\overline{GP}_{ap}$  (antes da desramificação) e o  $\overline{GP}$  (após a desramificação) (ANGELLIER-COUSSY et al., 2009)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Composição das cadeias de alto e baixo peso molecular dos NCA determinada por GPC

Os perfis de eluição dos NCA de batata, mandioca e milho obtidos por GPC em Bio-Gel P6 permitiram a separação das amostras em quatro frações (I-IV, Figura 1). As frações I, III e IV correspondem às cadeias longas ramificadas, cadeias lineares e cadeias muito curtas, respectivamente, presentes nos NCA (ROBIN et al, 1974; JACOBS et al., 1998). A fração II (mistura das cadeias I e III) não foi analisada por ser composta de uma mistura de cadeias lineares e ramificadas e, portanto não foi considerada uma amostra representativa.

As cadeias dos NCA e das frações I, III e IV foram determinadas por HPAEC-PAD (Figura 3) e os dados da concentração molar foram resumidos na Tabela 1. Os NCA de batata (tipo B), mandioca e milho (tipo A) continham cadeias com  $GP_{ap}$  2-44, 2-42 e 2-52, respectivamente. Duas populações distintas foram observadas, independente da fonte botânica, sendo a primeira composta por cadeias lineares e a segunda por cadeias uniramificadas com picos em  $GP_{ap}$  11-12 e 22, respectivamente, com exceção dos NCA de batata que na segunda população exibiram um ombro próximo ao  $GP_{ap}$  25. Esses resultados indicam que os NCA de batata continham menor proporção de cadeias uniramificadas que os demais NCA. Jane, Wong e McPherson (1997) e Srichunwong et al. (2005) também observaram um ombro nos NCA de batata.



**Figura 3** – Cromatogramas HPAEC-PAD dos NCA e das frações I, III e IV de batata, mandioca e milho.

Na distribuição de cadeias das frações I, III e IV obtidas por GPC, verificou-se que, independente da fonte botânica, a fração I era composta por cadeias com  $GP_{ap} \geq 24$ , a fração III por cadeias com  $GP_{ap}$  9-23 e a fração IV por cadeias com  $GP_{ap}$  2-8 (Figura 3). Esses intervalos foram considerados também para os NCA. Assim, os NCA de milho e mandioca continham maior quantidade de cadeias com  $GP_{ap} \geq 24$  (23,2 e 19,7 mol%, respectivamente) que os NCA de batata (17,3%) (Tabela 1). Os pontos de ramificação dispersos na lamela cristalina dos NCA tipo A protegeram as cadeias mais

internas da amilopectina do ataque ácido e assim, cadeias mais longas foram observadas nos NCA de milho e mandioca (Figura 3). Independente do tipo cristalino, os NCA continham mais de 70 mol % de cadeias com  $GP_{ap}$  9-23 (Tabela 1), indicando NCA majoritariamente compostos por duplas hélices estáveis. As cadeias com GP 13-24 apresentam tamanho ideal para formarem duplas hélices mais perfeitas promovendo um denso empacotamento da região cristalina (GENKINA et al., 2007).

**Tabela 1** – Concentração molar relativa (mol %) dos NCA de batata, mandioca e milho e suas frações I e III.

Conc.molar (mol %)	$GP_{ap} \geq 24$	$GP_{ap}$ 9-23	$GP_{ap}$ 2-8	$\overline{GP}_{ap}$
<b>Batata</b>				
NCA*	17,3	78,5	4,2	14,8
Fração I	71,3	27,5	1,2	27,8
Fração III	0,4	96,2	3,4	13,6
<b>Mandioca</b>				
NCA*	19,7	73,9	6,4	14,1
Fração I	74,0	20,1	5,9	29,4
Fração III	1,8	93,4	4,8	12,9
<b>Milho</b>				
NCA*	23,2	70,7	6,1	14,5
Fração I	69,2	28,7	2,1	29,9
Fração III	1,7	91,9	6,4	12,5

\*Calculado com base nas cadeias observadas na Figura 3.

Os amidos de mandioca e milho foram mais suscetíveis à hidrólise ácida do que o amido de batata (Capítulo II), com isso, cadeias com  $GP_{ap}$  2-8 estavam presentes em maior proporção nos NCA de mandioca e de milho (~6%) quando comparado aos NCA de batata (4,2%). Essas curtas cadeias presentes nos NCA são resultantes da hidrólise das longas cadeias ramificadas do amido que são mais facilmente hidrolisadas. A organização lamelar e a superfície dos grânulos de amido influenciam a hidrólise ácida. O amido de mandioca apresenta defeito na estrutura cristalina (CAMPANHA;

FRANCO, 2011) enquanto os grânulos de amido de milho têm uma superfície porosa (HUBER; BEMILLER, 2000), características que contribuem para que esses amidos, com padrão cristalino A, se tornem mais suscetíveis ao ataque ácido que os amidos com padrão tipo B.

Independente da fonte botânica, a fração I obtida por GPC e analisada por HPAEC-PAD continha aproximadamente 72 mol % de cadeias com  $GP_{ap} \geq 24$  e  $\overline{GP}_{ap}$  de ~29 (Tabela 1). Essa fração corresponderia às cadeias ramificadas longas que são observadas após a hidrólise do amido. O cromatograma da fração I do NCA de milho exibiu ainda picos adicionais, referentes às cadeias mais internas ligadas aos pontos de ramificação, como também observado no NCA (Figura 3) e que foram protegidas do ácido durante a hidrólise. Por outro lado, a fração III continha mais de 90 mol % de cadeias com  $GP_{ap}$  9-23 e  $\overline{GP}_{ap}$ le ~13. Essas cadeias corresponderiam às cadeias lineares que formam duplas hélices estáveis e compõe a lamela cristalina. As lamelas cristalinas, região de alta densidade, são mais resistentes à hidrólise, enquanto as extremidades das estruturas cristalinas são mais suscetíveis, indicando que as interações entre e dentro das duplas hélices dificultam a ação do ácido (VERMEYLEN et al., 2004) e essas cadeias lineares permanecem preservadas.

A fração IV obtida por GPC e também analisada por HPAEC-PAD teve um  $\overline{GP}_{ap}$  de ~5, independente da fonte botânica. Essas cadeias são derivadas das longas cadeias de amilopectina do amido e por serem muito curtas não são consideradas parte da estrutura cristalina (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; SRICHUNWONG et al., 2005; PALMA-RODRIGUEZ et al., 2012; GOLDSTEIN et al., 2016). Por isso elas não foram consideradas para os cálculos de concentração molar relativa apresentado na Tabela 1. Assim, as frações I e III foram consideradas representativas para o estudo das estruturas das cadeias de alto e baixo peso molecular, respectivamente.

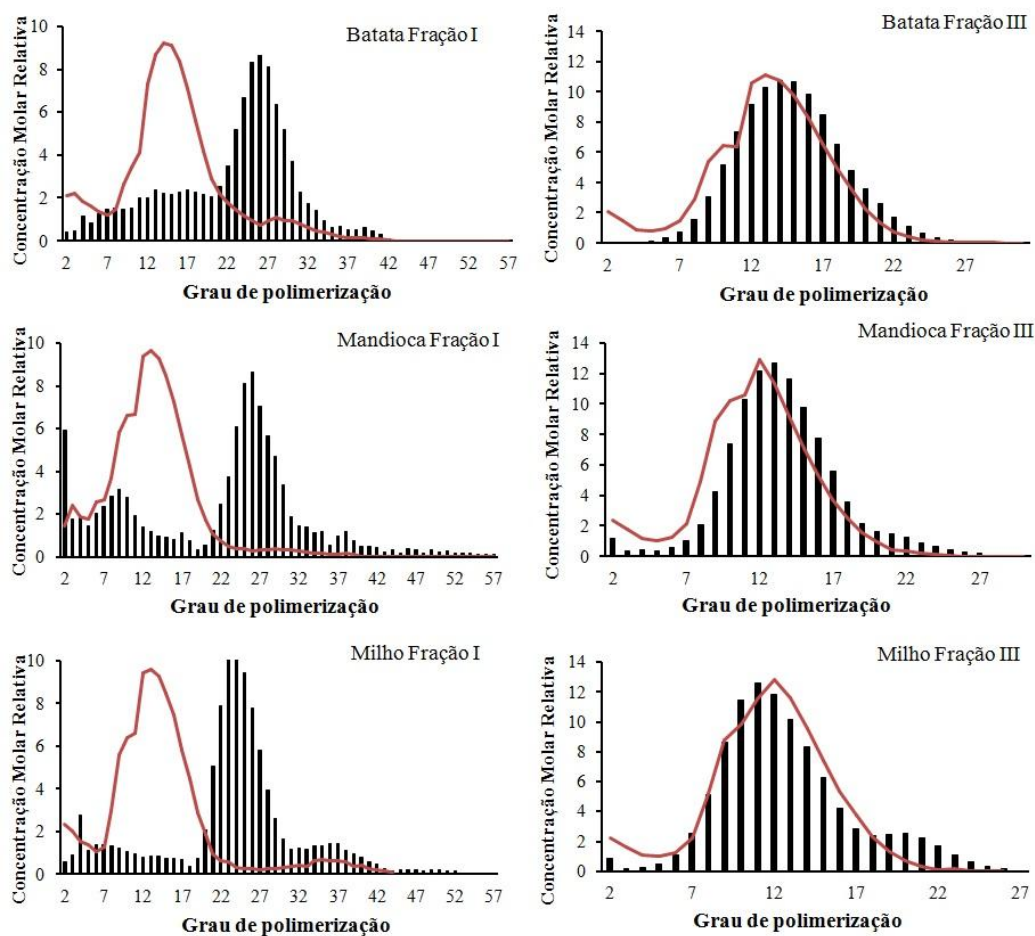
## 3.2. Tratamento enzimático das frações I e III obtidas por GPC

### 3.2.1. Ação das enzimas desramificantes seguidas da $\beta$ -amilase

A isoamilase cliva rapidamente as ligações  $\alpha$ -(1-6) nas cadeias longas, enquanto a pululanase consegue quebrar as pequenas cadeias ramificadas com maior eficiência (TESTER; QI, 2011). Porém, essas enzimas não conseguem hidrolisar o ponto de ramificação quando o mesmo está ligado a um único resíduo de glicose e atuam muito lentamente no resíduo maltosil (TESTER; QI, 2011). As frações I e III obtidas por GPC foram desramificadas com isoamilase e pululanase e analisadas por HPAEC-PAD (Figura 4). A desramificação das frações I e III confirmou que os NCA, de um modo geral, eram formados por dextrinas uniramificadas com cadeias de GP 22-57 e por dextrinas lineares com cadeias de GP 6-21 (ROBIN et al., 1974; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; VERMEYLEN et al., 2004), respectivamente.

A fração I dos NCA exibiu altas proporções de cadeias curtas (GP 1-5) após a ação das enzimas desramificantes (Figura 6), pois as cadeias ramificadas longas foram hidrolisadas em frações menores. Essas frações não são consideradas como parte da estrutura cristalina por serem resíduos solúveis, os quais podem ser facilmente removidos por lavagens dos cristais (BERTOFT, 2004; ANGELLIER-COUSSY et al., 2009; GOLDSTEIN et al., 2016).

As cadeias com  $GP_{ap} > 22$  foram mais suscetíveis à ação das enzimas, resultando no aumento das cadeias lineares com  $GP \leq 21$ . Bertoft (2004) observou que as cadeias com  $GP > 21$  são mais suscetíveis às enzimas desramificantes principalmente quando as enzimas são utilizadas em conjunto. Mesmo após desramificação, cadeias com  $GP > 25$  foram observadas em altas proporções nos NCA de batata e milho e em menor proporção nos NCA de mandioca. Essas cadeias eram referentes às cadeias lineares mais longas observadas na estrutura cristalina.



**Figura 4** – Concentração molar relativa das frações I e III dos NCA de batata, mandioca e milho antes (barras) e após a desramificação (linha vermelha).

Houve um aumento substancial na proporção de cadeias com GP 13-24 na fração I, independente da fonte dos NCA (Figura 4). O  $\overline{GP}$  dessas cadeias foi de 15, 12, e 13 para os NCA de batata, mandioca e milho respectivamente, comprimentos de cadeias ideais para formar duplas hélices perfeitas (GENKINA et al., 2007).

A fração III apresentou praticamente o mesmo perfil antes e após desramificação (Figura 4), sugerindo que a fração III era composta, basicamente, por cadeias lineares com  $\overline{GP}$  de 14,7, 12,2, e 13,2 nos NCA de batata, mandioca e milho, respectivamente. Considerando que a distância de cada unidade de glicose é de 0,35 nm (JANE et al., 1999), verificou-se que as duplas hélices dos NCA tinham comprimento de 5,1, 4,3 e 4,6 nm, respectivamente para batata, mandioca e milho. Esses resultados confirmaram

que a lamela cristalina nos grânulos de amido do padrão tipo B era mais espessa que aquelas do padrão A. Resultados semelhantes foram observados por Gallant et al. (1997).

O número de cadeias (NC) por molécula das frações I e III foi estimado através da relação entre o GP antes e após desramificação (Tabela 2). O NC dos NCA, independente do padrão cristalino, foi de aproximadamente 2 na fração I e 1 na fração III, indicando que duas cadeias ramificadas eram interligadas por uma cadeia linear. Essa organização das duplas hélices dos NCA foi observada primeiramente por Umeki e Kainuma (1981) e confirmada em estudos posteriores por Angellier-Coussy et al. (2009).

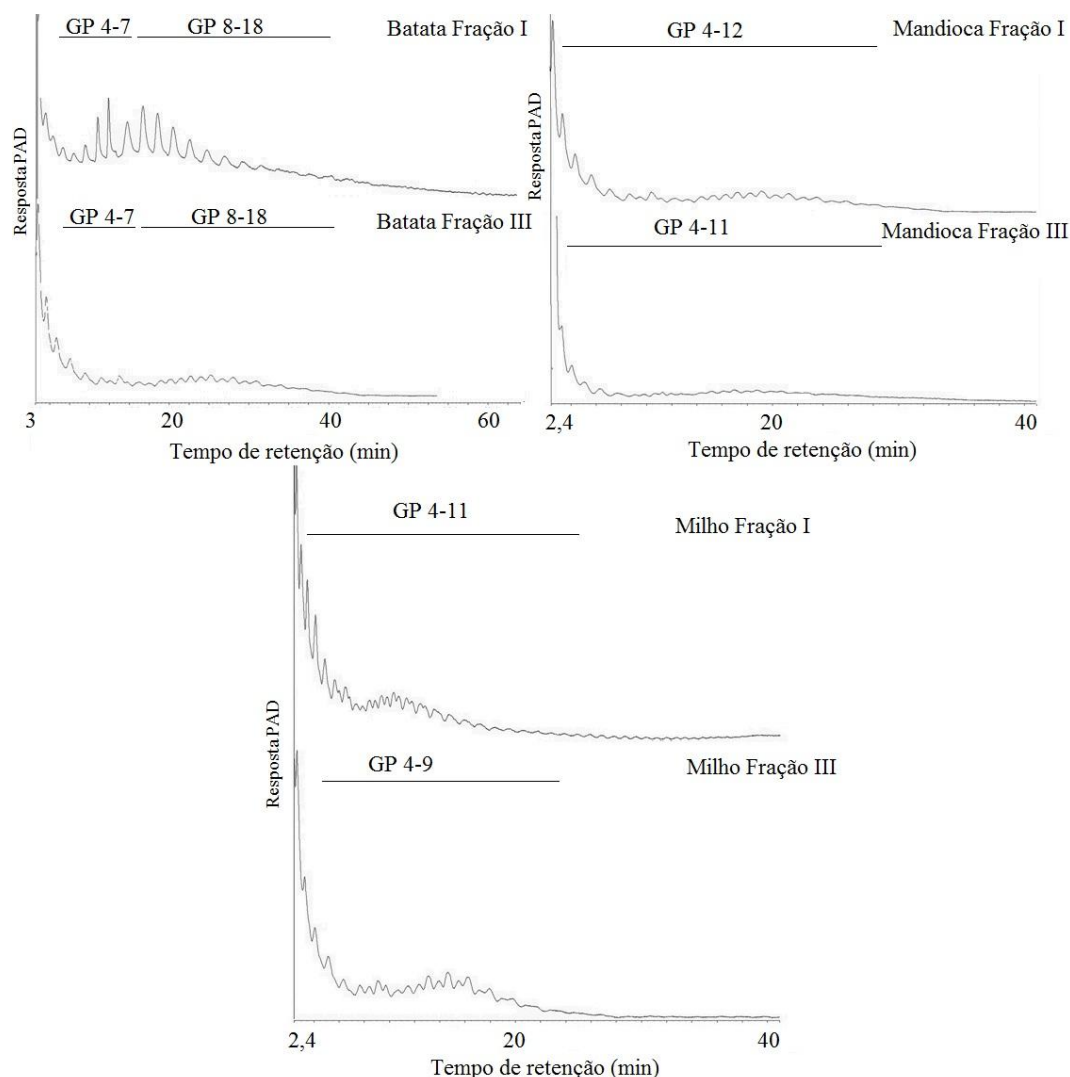
Após desramificação, as frações foram tratadas com  $\beta$ -amilase (Figura 5 e Tabela 2). A  $\beta$ -amilase quebra as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) sequencialmente, de duas em duas, a partir da extremidade não-redutora da molécula. A ação da enzima cessa quando ela se aproxima de um ponto de ramificação (ligação glicosídica  $\alpha$ -1,6) ou de alguma mudança estrutural da molécula (TESTER; QI, 2011). Os produtos da reação são então, maltose (GP 2), maltotriose (GP 3) e  $\beta$ -dextrinas limite ( $\beta$ -DL). Todas as cadeias com  $GP_{ap} \geq 4$  foram consideradas  $\beta$ -DL (ANGELLIER-COUSSY et al., 2009). Caso as cadeias lineares, obtidas após a desramificação das frações I e III, fossem totalmente hidrolisadas seriam observadas somente moléculas de maltose ou maltotriose, porém os altos picos de maltose e maltotriose e as cadeias com  $GP \geq 4$  confirmaram a hidrólise parcial das frações pela  $\beta$ -amilase. As cadeias observadas nas distribuições da fração I dos NCA (Figura 5), independente da fonte botânica, foram originárias das cadeias com  $GP > 24$  da fração I original obtida por GPC (Figura 3).

**Tabela 2** – Caracterização das frações I e III dos NCA após diferentes tratamentos enzimáticos e analisadas por HPAEC-PAD

	Batata		Mandioca		Milho	
	Fração I	Fração III	Fração I	Fração III	Fração I	Fração III
<i>Após desramificação</i>						
GP d*	2-45	2-34	2-39	2-23	2-43	2-23
$\overline{GP}$ d	14,7	12,6	12,2	10,8	13,2	10,3
NC	1,9	1,1	2,4	1,1	2,3	1,2
CCE	10,0	10,4	8,1	7,7	8,2	7,7
CCI	3,7	1,2	3,1	2,1	4,0	1,6
<i>Desramificação + <math>\beta</math>-amilase</i>						
GP d $\beta$ -DL**	4-17	4-18	4-12	4-11	4-11	4-15
$\overline{GP}$ d $\beta$ -DL	10,8	9,4	8,0	5,9	5,9	5,7
<i>Após a <math>\beta</math>-amilase</i>						
GP <sub>ap</sub> $\beta$ -DL***	4-30	4-18	4-18	4-18	4-15	4-15
$\overline{GP}$ <sub>ap</sub> $\beta$ -DL	10,4	8,4	6,1	5,7	6,2	5,7
Dextrinas lineares (mol %)	45,0	68,4	78,4	76,1	78,0	70,3
Dextrinas ramificadas (mol %)	55,0	31,6	21,6	23,9	22,0	29,7
<i>Após a <math>\beta</math>-amilase + desramificação</i>						
GP $\beta$ -DL+d	4-39	4-18	4-36	4-18	4-23	4-18
$\overline{GP}$ $\beta$ -DL+d	11,8	7,3	8,8	9,6	8,9	10,7

\*d: cadeias obtidas após a ação das enzimas desramificantes. \*\*d $\beta$ -DL: cadeias desramificadas após a ação da  $\beta$ -amilase. \*\*\* $\beta$ -DL:  $\beta$ -dextrinas limite obtidas após a ação da  $\beta$ -amilase. NC: número estimado de cadeias ( $\overline{GP}_{ap}$  antes da desramificação /  $\overline{GP}$  após desramificação); CCE: comprimento de cadeias externas ( $\overline{GP} \times \beta$ -DL/100 + 2); CCI: comprimento de cadeias internas ( $\overline{GP} - CCE - 1$ ).





**Figura 5** – Cromatograma HPAEC-PAD das frações I e III dos NCA de batata, mandioca e milho desramificados e hidrolisados por  $\beta$ -amilase.

As  $\beta$ -DL desramificadas das frações I e III dos NCA de batata exibiram uma distribuição bimodal com picos no GP 4-7 ( $\overline{GP}$  5) e GP 8-18 ( $\overline{GP}$  12), enquanto  $\beta$ -DL desramificadas de ambas as frações dos NCA de mandioca e milho exibiram um único pico próximo ao GP 4-12 ( $\overline{GP}$  ~6) (Figura 5). Esses resultados indicam que a fração III apresentava, além de cadeias lineares, cadeias ramificadas muito curtas resistentes à desramificação. Essas ramificações consistem de cadeias uniramificadas, quando somente um único grupo glicosil é ligado ao ponto de ramificação (ROBIN et al., 1974; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; VERMEYLEN et al., 2004; BERTOFT, 2004;

KIM et al., 2012). A segunda população de cadeias (GP 8-18), observadas na fração III dos NCA de batata, era referente às cadeias ramificadas mais longas. Wikman, Blennow e Bertoft (2013) sugeriram que a presença de grupos fosfatos nos *lintners* de batata torna essas cadeias resistentes à desramificação.

A estrutura molecular da fração III dos NCA é considerada complexa, por ser formada por cadeias lineares e uniramificadas, e alguns NCA, como os de batata, apresentam componentes menores como o fósforo que interferem na sua estrutura, fazendo com que o verdadeiro grau de desramificação dessas cadeias seja difícil de ser estimado (BERTOFT, 2004; ANGELLIER-COUSSY et al., 2009; WIKMAN; BLENNOW; BERTOFT, 2013).

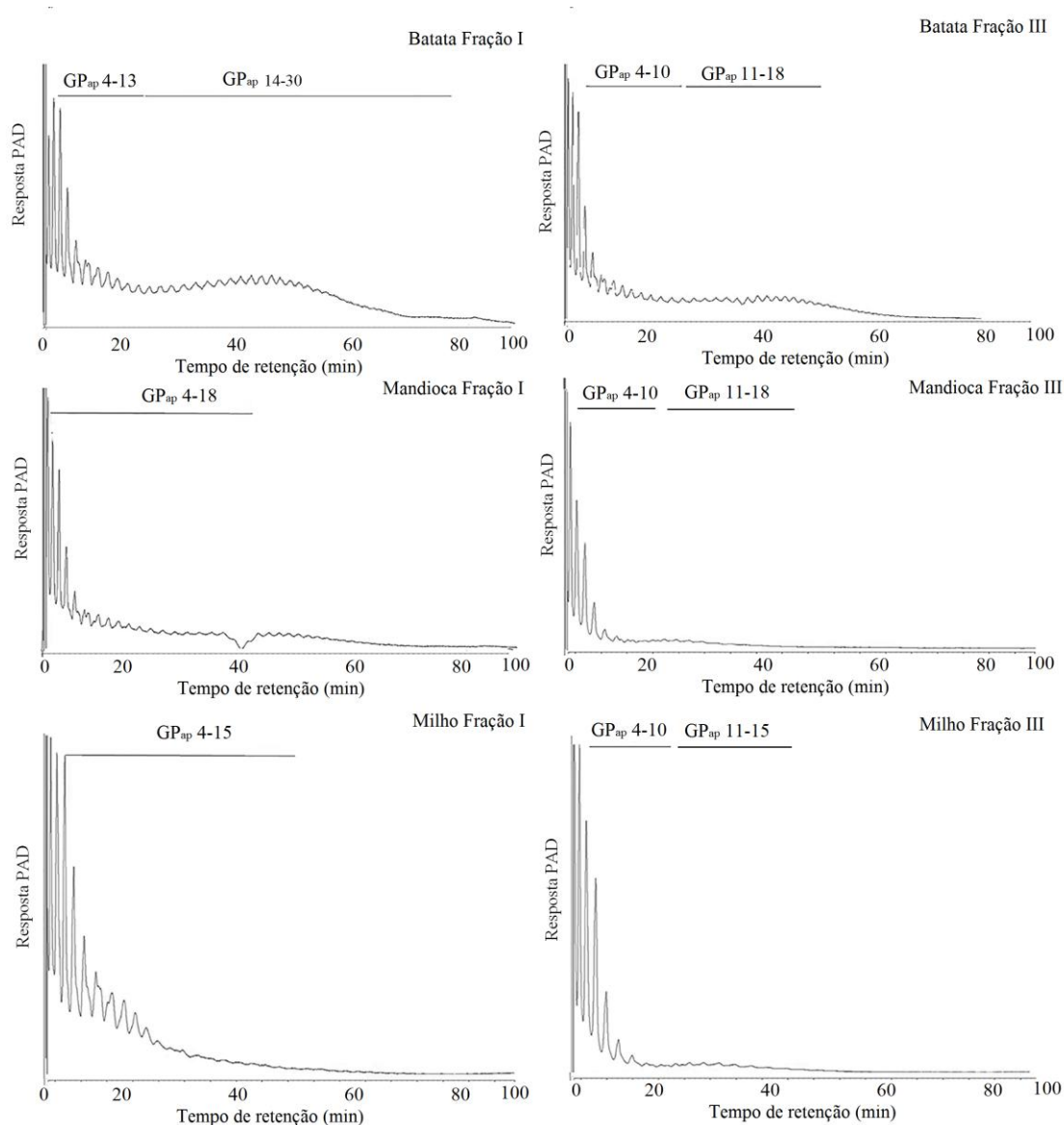
O comprimento médio de cadeias externas (CCE) das frações I e III dos NCA de batata foi semelhante e próximo a 10,2, enquanto o CCE das frações I e III dos NCA tipo A foi de aproximadamente 8,1 e 7,7, respectivamente (Tabela 2). O maior CCE dos NCA de batata ocorre em função do maior comprimento de suas duplas hélices. Por outro lado, o comprimento médio de cadeias internas (CCI) da fração I dos NCA de batata, mandioca e milho foi de 3,7, 3,1 e 4,0, respectivamente. Estes valores são bem inferiores àqueles observados para os CCI dos *clusters* da amilopectina dos amidos de batata, mandioca e milho que foram encontrados ser de 6 – 9 (YUSUPH et al., 2003; ZHU; BERTOFT, 1996), 4,4 – 5,5 (LAOHAPHATANALEART et al., 2010) e 7 – 8 (YUN; MATHESON, 1993; KLUCINEC; THOMPSON, 2002), respectivamente, indicando que as cadeias internas dos *clusters* foram suscetíveis ao ácido. No entanto, as cadeias internas do amido de batata foram as mais degradadas durante a hidrólise, confirmando que os pontos de ramificação dispersos nas regiões cristalinas dos NCA do tipo A protegeram essas cadeias.

### 3.2.2 Ação da $\beta$ -amilase seguida da desramificação

Os perfis da distribuição de cadeias obtidos da  $\beta$ -amilólise das frações I e III determinados por HPAEC-PAD estão apresentados na Figura 6 e os resultados sumarizados na Tabela 2.

Grandes picos de maltose e maltotriose foram observados nos cromatogramas, independente da fração ou da fonte botânica dos NCA. Esses resultados indicaram que a parte externa das cadeias ramificadas das frações foi hidrolisada o que resultou em pequenas cadeias ligadas aos pontos de ramificação e denominadas de  $\beta$ -dextrinas limite ( $\beta$ -DL).

As  $\beta$ -DL da fração I dos NCA de batata exibiram uma distribuição bimodal com o primeiro pico no  $GP_{ap}$  4-13 ( $\overline{GP}_{ap}$  6,2) e o segundo pico no  $GP_{ap}$  14-30 ( $\overline{GP}_{ap}$  21,1) (Figura 6), enquanto um único pico foi observado nos cromatogramas da fração I dos NCA de mandioca ( $GP_{ap}$  4-18) e milho ( $GP_{ap}$  4-15), respectivamente, submetidas à ação da  $\beta$ -amilase. Essas  $\beta$ -DL da fração I dos NCA de mandioca e de milho apresentaram ainda quantidades muito pequenas de cadeias difíceis de serem quantificadas no tempo de retenção 30 a 60 min. Essas cadeias com baixo sinal PAD eram referentes às cadeias mais internas que estavam ligadas aos pontos de ramificação. Esses resultados sugerem que parte das cadeias longas ( $GP_{ap} > 23$ ) da fração I dos NCA de batata foram resistentes à ação da  $\beta$ -amilase, enquanto as longas cadeias da fração I dos NCA de mandioca e milho foram suscetíveis. De acordo com Jane, Wong e Macpherson (1997), os pontos de ramificação dispersos nas regiões cristalinas do padrão tipo A apresentam distâncias mais curtas entre si do que aqueles dispersos nas regiões cristalinas do padrão tipo B. Com isso, a estrutura tipo A possui cadeias A mais curtas, derivadas das ramificações localizadas na região cristalina formando uma estrutura cristalina inferior que, por conter mais pontos de ramificação e duplas hélices de cadeias curtas, é mais susceptível à hidrólise enzimática.



**Figura 6** – Cromatogramas HPAEC-PAD das frações I e III hidrolisadas por  $\beta$ -amilase.

Aquelas cadeias da fração I dos NCA tipo B, resistentes à  $\beta$ -amilase, indicaram que a maioria dos pontos de ramificação dessa fração estavam posicionadas próximos às extremidades não-redutoras da estrutura bloqueando a ação da enzima. Nos NCA tipo A, a maioria das cadeias ramificadas mais curtas estavam ligadas aos pontos de ramificação localizados próximos às extremidades redutoras. Angellier-Coussy et al. (2009) observaram que  $\frac{1}{3}$  das ramificações dos NCA de milho ceroso (padrão A) estavam na extremidade não-redutora e  $\frac{2}{3}$  na extremidade redutora, enquanto Goldstein

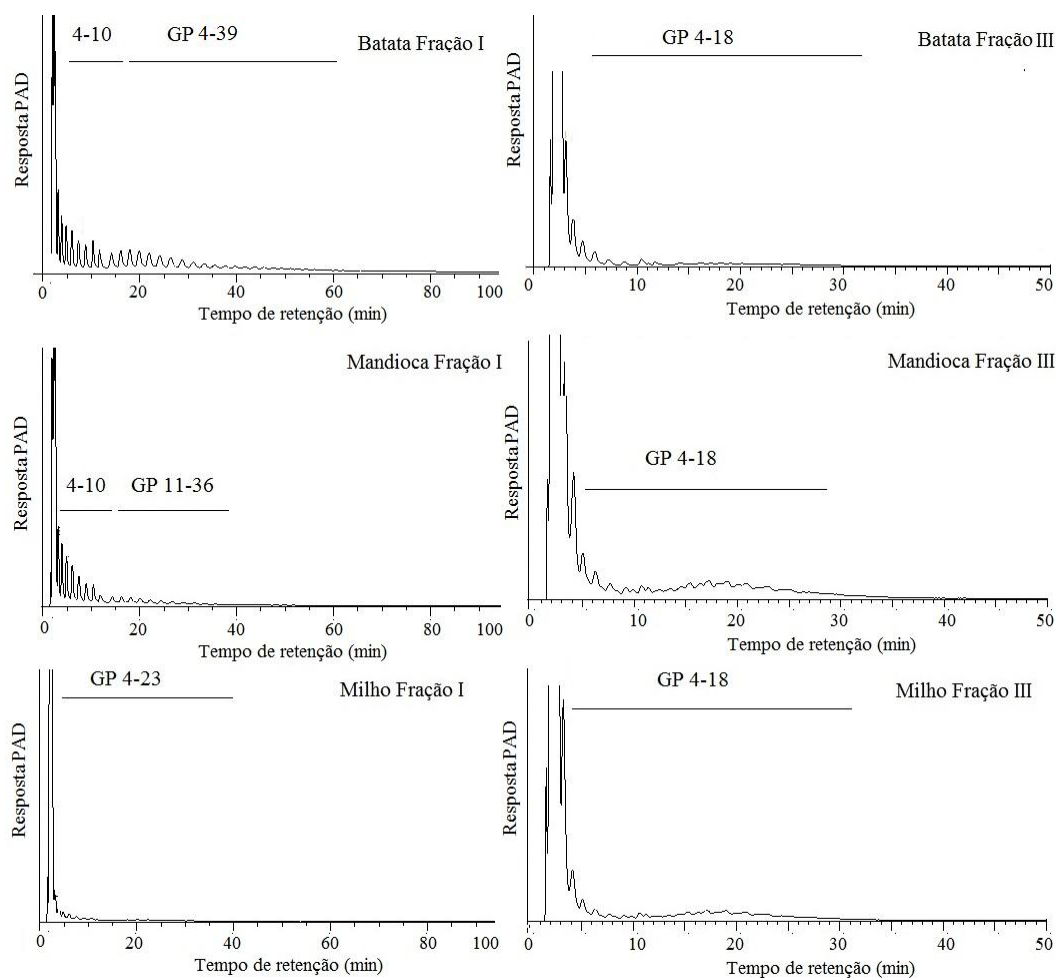
et al. (2016) observaram que os NCA de amilose de cevada (padrão B) tinham suas ramificações na extremidade não-redutora.

Por outro lado, as  $\beta$ -DL da fração III, independente da fonte botânica, exibiram uma distribuição bimodal com o primeiro pico no  $GP_{ap}$  4-10 e o segundo pico no  $GP_{ap} \geq 11$ . A primeira população de cadeias, com  $\overline{GP}_{ap}$  de  $\sim 4,8$ , é resultado da degradação das cadeias lineares mais longas da fração III pela  $\beta$ -amilase. A segunda população de  $\beta$ -DL corresponde às cadeias uniramificadas resistentes à ação da enzima, como confirmado pela comparação  $\overline{GP}_{ap}$  da fração III (Tabela 1) com o  $\overline{GP}_{ap}$  das  $\beta$ -DL de batata, mandioca e milho (15,0, 12,9 e 12,7, respectivamente). Esses resultados sugerem que essas ramificações estavam posicionadas próximas à extremidade não-redutora da estrutura cristalina.

Para confirmar a localização dos pontos de ramificação nos NCA, as  $\beta$ -DL foram desramificadas com isoamilase e pululanase (Figura 7). As  $\beta$ -DL desramificadas da fração I de batata e mandioca exibiram uma distribuição bimodal com picos no  $GP$  4-10 ( $\overline{GP} \sim 6,5$ ) e 11-39 ( $\overline{GP} \sim 16,1$ ), enquanto as  $\beta$ -DL desramificadas de milho exibiram um único pico no  $GP$  4-23 ( $\overline{GP} 8,9$ ). O  $\overline{GP}$  da  $\beta$ -DL desramificadas foi maior do que o  $\overline{GP}_{ap}$  da  $\beta$ -DL da fração I de mandioca e milho, sugerindo que após desramificação as cadeias internas que estavam protegidas pelos pontos de ramificação nos NCA tipo A ficaram expostas. As  $\beta$ -DL da fração I de batata desramificadas (Figura 7) exibiram um perfil semelhante àquele antes da desramificação (Figura 6), confirmando que os NCA desta fração foram resistentes à ação da  $\beta$ -amilase.

Perfis de distribuição de cadeias semelhantes foram observados para as  $\beta$ -DL da fração III, antes (Figura 6) e após a desramificação (Figura 7), independente da fonte botânica. Como observado na Figura 4, a fração III apresentava cadeias lineares e uniramificadas que foram resistentes à ação das enzimas desramificantes. As  $\beta$ -DL desramificadas dos NCA de batata tiveram  $\overline{GP}$  menor que as suas  $\beta$ -DL, enquanto as  $\beta$ -DL desramificadas dos NCA de mandioca e milho tiveram  $\overline{GP}$  maior que suas  $\beta$ -DL, indicando que as cadeias lineares dos NCA tipo A foram suscetíveis a  $\beta$ -amilase, enquanto os NCA tipo B foram resistentes. Como discutido anteriormente, os componentes menores, como fósforo, podem estar ligados à estrutura dos NCA de batata bloqueando a ação das enzimas. Angellier-Coussy et al. (2009) também

observaram a ação incompleta dessas enzimas nos NCA de milho ceroso. Após desramificação, as  $\beta$ -DL de mandioca e milho apresentaram  $\overline{GP}$  maior que aquele anterior à desramificação indicando que as cadeias mais longas desta fração foram suscetíveis às enzimas.



**Figura 7** – Cromatogramas HPAEC-PAD das frações I e III hidrolisadas por  $\beta$ -amilase seguida da desramificação.

### 3.3. Organização molecular dos NCA com padrões cristalinos A e B e influencia na sua morfologia

O estudo enzimático das frações I e III ajudou a diferenciar as estruturas moleculares dos NCA com padrões cristalinos A e B. Os NCA eram constituídos de

aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de cadeias com  $GP_{ap} \geq 24$  (fração I) e  $\frac{3}{4}$  de cadeias com  $GP_{ap}$  9-23 (fração III). Um modelo baseado nos estudos de Robin (1974), Umeki e Kainuma (1981), Bertoft (2004) e Angellier-Coussy et al. (2009) é proposto para diferenciar as estruturas moleculares dos NCA com padrões cristalinos A e B. Angellier-Coussy et al. (2009) observaram que dependendo da posição das ramificações nos NCA, dois principais componentes moleculares (frações I e III) permanecem na estrutura cristalina.

Os componentes de alto (fração I) e baixo (fração III) peso molecular dos NCA apresentaram, após estudos enzimáticos, cinco tipos de estruturas semelhantes, as quais estão apresentadas na Figura 8 para os NCA tipo A e na Figura 9 para os NCA tipo B: (1) maltose e maltotriose: obtidas após extensiva hidrólise com  $\beta$ -amilase, a maior quantidade dessas moléculas estavam presentes no padrão tipo A; (2) duplas hélices ligadas aos pontos de ramificação: a maioria delas no padrão tipo B estavam nas extremidades não-redutoras, enquanto a maioria daquelas do padrão tipo A nas extremidades redutoras; (3) dextrinas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e enzimas desramificantes: presentes nas estruturas tipo A e B. Cadeias com menores tamanhos foram observadas no padrão A devido à suscetibilidade enzimática das cadeias internas protegidas do ácido pelos pontos de ramificação; (4) estruturas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e resistentes às enzimas desramificantes: observadas nos dois padrões cristalinos; (5) cadeias uniramificadas: a ação da  $\beta$ -amilase após a desramificação confirma que as mesmas estão ligadas às extremidades redutoras e não-redutoras.

Este modelo sugere que as cadeias uniramificadas estabilizam as regiões cristalinas dos NCA. Os maiores comprimentos de cadeias externas e a menor quantidade de pontos de ramificação e maltose e maltotriose nos NCA tipo B favoreceram a obtenção de estruturas mais rígidas.

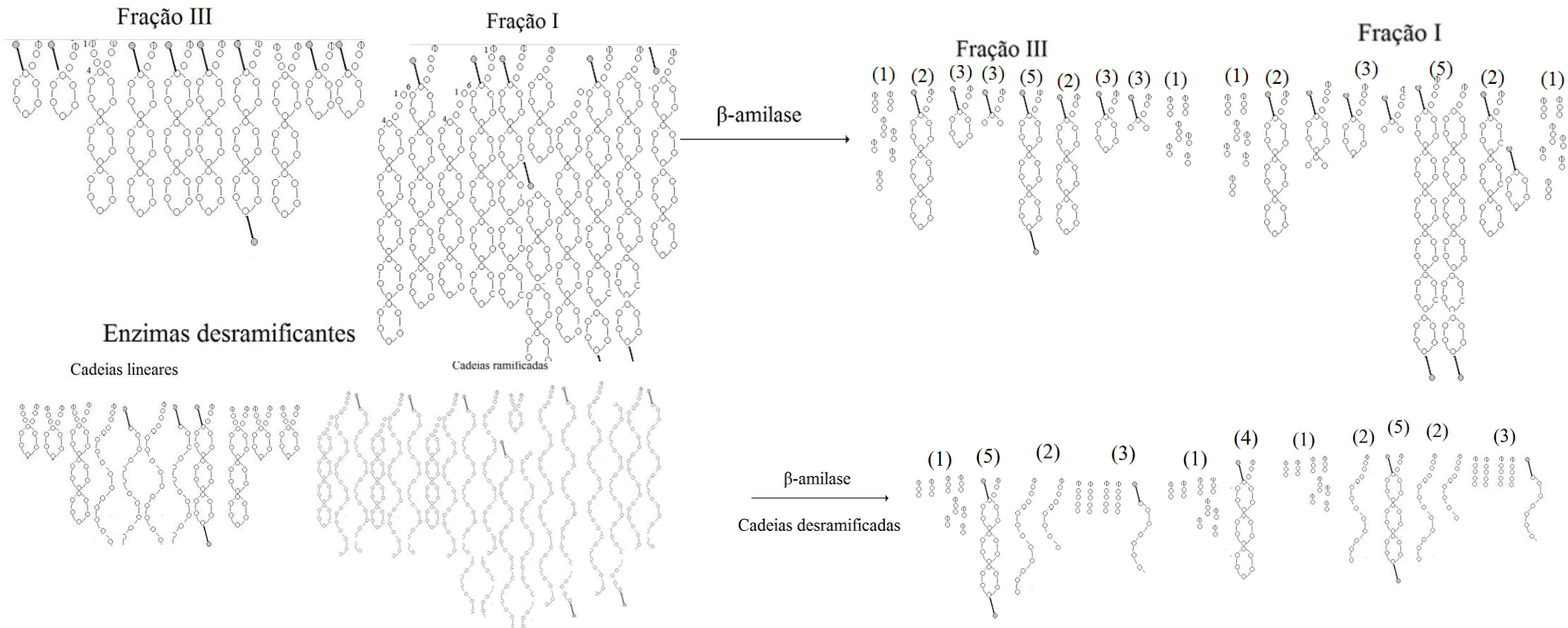
A morfologia das nanopartículas foi observada em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) e está apresentada no Capítulo II. Os NCA apresentaram diferentes morfologias de acordo com seu padrão cristalino. Os NCA tipo A exibiram formato de plaquetas, enquanto os do tipo B exibiram formatos arredondados. De acordo com Imberty et al. (1991), Putaux et al. (2003) e Hansen et al. (2008), as duplas hélices nos NCA são orientadas perpendicularmente ao plano cristalino quando observadas por MET. Esta observação destaca a importância da organização das duplas hélices na

morfologia dos NCA. A presença de cadeias uniramificadas nos NCA após ação das enzimas desramificantes confirma que alguns pontos de ramificação foram resistentes à hidrólise ácida. Os NCA tipo A tiveram maior quantidade de pontos de ramificação dispersos na estrutura, os quais protegeram suas cadeias internas. Estes resultados sugerem que o empilhamento das plaquetas umas sobre as outras, observado no padrão tipo A está relacionado com os pontos de ramificação que se posicionam lado a lado de forma ordenada e determinam os planos cristalinos.

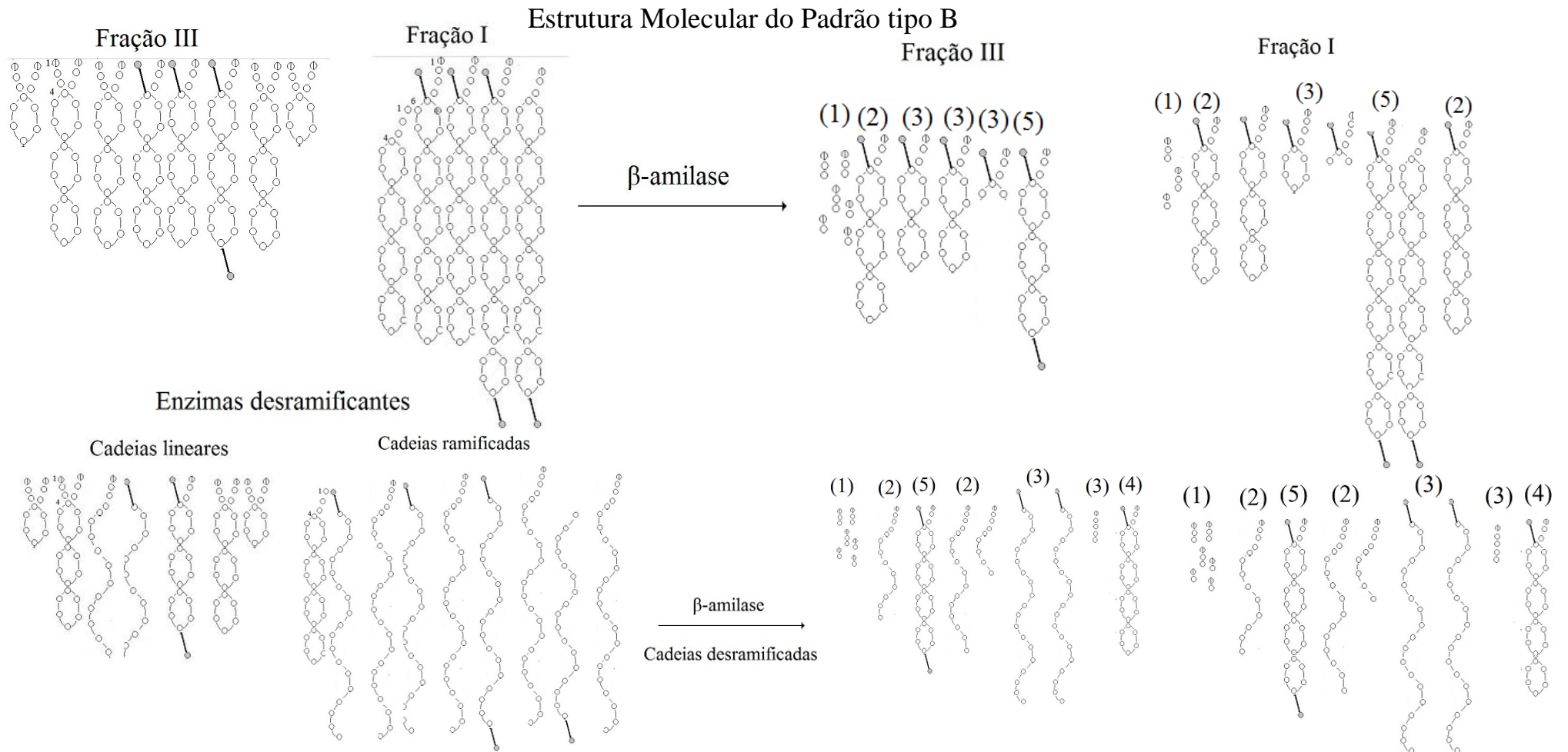
Os NCA tipo B apresentam menores quantidades de ramificações, o que influencia no empacotamento mais aberto das duplas hélices, pois esses pontos de ramificação vão se posicionando lado a lado e as cadeias maiores vão intercalando em mais de um plano cristalino, favorecendo a maior ligação com a água, com isso formatos mais arredondados são observados. As partículas dos NCA tipo B são mais fáceis de serem isoladas que as do padrão tipo A, pois as plaquetas tendem a se aglomerar em função da maior quantidade de hidroxilas livres presentes em sua superfície, assim partículas individuais são difíceis de serem observadas. Esses resultados puderam ser comprovados pela análise de microscopia e FTIR-ATR observadas no Capítulo II.



## Estrutura Molecular do Padrão tipo A



**Figura 8** – Estrutura molecular dos NCA tipo A. (1) maltose e maltotriose; (2) duplas hélices ligadas aos pontos de ramificação; (3) dextrinas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e enzimas desramificantes; (4) estruturas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e resistentes às enzimas desramificantes; (5) cadeias uniramificadas.  $\oplus$  Extremidade redutora.  $\ominus$  Extremidade não-redutora. — Ligação ramificada.



**Figura 9** – Estrutura molecular dos NCA tipo B. (1) maltose e maltotriose; (2) duplas hélices ligadas aos pontos de ramificação; (3) dextrinas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e enzimas desramificantes; (4) estruturas suscetíveis à  $\beta$ -amilase e resistentes às enzimas desramificantes; (5) cadeias uniramificadas.  $\oplus$  Extremidade redutora.  $\ominus$  Extremidade não-redutora. — Ligação ramificada.

#### 4. CONCLUSÃO

Os NCA constituem duplas hélices estáveis formadas por cadeias com comprimento variando de 10 a 15 unidades de glicose. Os NCA tipo A possuem maior quantidade de pontos de ramificação, os quais protegeram as cadeias mais internas e de maior comprimento durante a hidrólise ácida. A maioria das ramificações dos NCA tipo B, em menor quantidade, estão localizadas próximas às extremidades não-redutoras, enquanto aquelas dos NCA tipo A estão próximas às extremidades redutoras. O formato arredondado dos NCA tipo B é influenciado pela menor quantidade pontos de ramificação na lamela cristalina e pelas cadeias mais longas que são intercaladas em mais de um plano cristalino favorecendo o empacotamento mais aberto das duplas hélices, enquanto o formato de plaqueta dos NCA tipo A é influenciado pela organização das duplas hélices e pelas curtas distâncias entre os pontos de ramificação que se posicionam lado a lado de forma ordenada na lamela cristalina.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANGELLIER, H.; CHOISNARD, L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; PATRICK, O.; DUFRESNE, A. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy Maize starch nanocrystals using a response surface methodology. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1545–1551, 2004.
- ANGELLIER-COUSSY, H.; PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S. N.; DUFRESNE, A.; BERTOFT, E.; PEREZ, S. The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1558–1566, 2009.
- BALL, S.; GUAN, H-P.; JAMES, M.; MYERS, A.; KEELING, P.; MOUILLE, G.; BULÉON, A.; COLONNAS, P.; PREISS, J. From Glycogen to amilopectin: A model for biogenesis of the plant starch granule. **Cell**, v.86, p. 349–352, 1996.
- BERTOFT, E. Lintnerization of two amylose-free starches of A- and B-crystalline types, respectively. **Starch/Stärke**, v. 56, p. 167–180, 2004.
- BERTOFT, E.; PIYACHOMKWAN, K.; CHATAKANONDA, P.; SRIROTH, K. Internal unit chain composition in amylopectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 527–543, 2008.
- BILIADERIS, C. G.; GRANT, D. R.; VOSE, J. R. Structural characterization of legume starches. II. Studies on acid-treated starches. **Cereal Chemistry**, v. 58, p. 502–507, 1981.

- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granule: structure and biosynthesis – Mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85–112, 1998.
- CAMPANHA, R. B.; FRANCO, C. L. M. Gelatinization properties of native starches and their Naëgeli dextrins. **Journal Thermal Analyses Calorimeter**, v. 106, n. 3, 799–804, 2011.
- COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527–1534, 2009.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. R.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–354, 1956.
- FRENCH, D. Chemical and physical of starch. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 1048–1061, 1973.
- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, n. 3-4, p. 177–191, 1997.
- GENKINA, N. K.; WIKMAN, J.; BERTOFT, E.; YURYEV, P. Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2329–2335, 2007.
- GOLDSTEIN, A.; ANNOR, G.; PUTAUX, J.-L.; HEBELSTRUP, K. H.; BLENNOW, A.; BERTOFT, E. Impact of full range of amylose contents on the architecture of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 305–318, 2016.
- HANSEN, P. I.; PUTAUX, J.-L.; BLENNOW, A.; ENGELSEN, S. B. **Nanocrystal platelets of A-and B-type starches: a preliminary study**. In: YURYEV, V. P.; TOMASIK, P. (Ed.), *Starch Science and Technology*, Nova Science Publishers, 2008, pp. 41–49.
- HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 342–347, 1986.
- HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Channels of maize and sorghum starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 269–276, 2000.
- IMBERTY, A.; BULÉON, A.; TRAN, V.; PEREZ, S. Recent advances in knowledge of starch structure. **Stärke/Starch**, v. 43, p. 375–384, 1991.

JACOBS, H.; EERLINGEN, R. C.; ROUSEU, N.; COLONNA, P.; DELCOUR, J. A. Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. **Carbohydrate Research**, v. 308, n. 3-4, p. 359-371, 1998.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205–213, 2006.

JANE, J. L.; WONG, K. S.; MCPHERSON, A. E. Branch-structure difference in starches of A- and B-type Xray patterns revealed by their Naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 300, p. 219–227, 1997.

JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effect of amylopectin branch length and amylase content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 665–680, 1999.

JIANG, H.; SRICHUWONG, S., CAMPBELL, M.; JANE, J.-L. Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part III: Structures and properties of the Naegeli dextrans. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 885–891, 2010.

KIM, H-Y; PARK, S. S.; LIM, S-T. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126 p. 607–620, 2015.

KIM, K.; LEE, J. H.; KIM, J. Y.; LIM, W. J.; LIM, S. T. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch/Stärke**, v.64, p. 367–373, 2012.

KLUCINEC, J. D.; THOMPSON, D. B. Structure of amylopectins from ae-containing maize starches. **Cereal Chemistry**, v. 65, p. 19–23, 2002.

KOCH, K.; ANDERSSON, R.; ÅMAN, P. Quantitative analysis of amylopectin unit chains by means of highperformance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p.199-206, 1998.

LAOHAPHATANALEART, K.; PIYACHOMKWAN, K.; KLANARONG, S.; BERTOFT, E. The fine structure of cassava starch amylopectin Part 1: Organization of clusters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 317–324, 2010.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Evidence of micro- and nanoscaled particles during starch nanocrystals preparation and their isolation. **Biomacromolecules**, n. 12, p. 3039–3046, 2011.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of starch's properties on starch nanocrystal thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 658–666, 2012.

MIAO, M.; JIANG, B.; ZHANG, T.; JIN, Z.; MU, Z. Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. **Food Chemistry**, v. 126, p. 506–513, 2011.

PALMA-RODRIGUEZ, H. M.; AGAMA-ACEVEDO, E.; MENDEZ-MONTEALVO, G.; GONZALEZ-SOTO, R. A.; VERNON-CARTER, E. J.; BELLO-PÉREZ, L. A. Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. **Starch/Stärke**, v. 64, p. 115–125, 2012.

PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; MOMAUR, T.; DUFRESNE, A. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1198–1202, 2003.

ROBIN, J. P.; MERCIER, M.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starch gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 389–406, 1974.

SRICHUWONG, S.; ISONO, N.; MISHIMA, T.; HISAMATSU, M. Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to acid and enzyme hydrolysis of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 115–121, 2005.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal science**, v. 39, p. 151–165, 2004.

TESTER, R. F.; QI, X.  $\beta$ -limit dextrin - Properties and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1899–1903, 2011.

UMEKI, K.; KAINUMA, K. Fine structure of nageli amylopectin obtained by acid treatment of defatted waxy-maize starch-structural evidence to support the double-helix hypothesis. **Carbohydrate research**, v. 96, p.143–159, 1981.

VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; REYNAERS, B.; DELCOUR, J. A. Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1775–1786, 2004.

WIKMAN, J.; BLENNOW, A.; BULLEON, A.; PUTAUX, J-L.; PÉREZ,S.; SEETHARAMAN, K.; BERTOFT, E. Influence of amylopectin structure and degree of phosphorylation on the molecular composition of potato starch lintners. **Biopolymers**, v. 101, n. 3, p. 257–271, 2013.

WIKMAN, J.; BLENNOW, A.; BERTOFT, E. Effect of amylose deposition on potato tuber starch granule architecture and dynamics as studied by lintnerization. **Biopolymers**, v. 99, p. 73–83, 2013.

YOO, S. H.; PERERA, C.; SHEN, J.; YE, L.; SUH, D. S.; JANE, J. Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1556–1564, 2009.

YUN, S-H.; MATHESON, N. K. Structures of the amylopectins of waxy, normal, amylose-extender, and wx:ae genotypes and the phytoglycogen of maize. **Carbohydrate research**, v. 243, p. 307–321, 1993.

YUSUPH, M.; TESTER, R. F.; ANSELL, R; SNAPE, C. E. Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under same environmental conditions. **Food Chemistry**, v. 82, p. 283–289, 2003.

ZHU, Q; BERTOFT E. Composition and structural analysis of alpha-dextrins from potato amylopectin. **Carbohydrate Research**, v. 41, p. 121–132, 1996.

# Capítulo IV

*Propriedades mecânicas e de barreira de filmes à base de amido de mandioca reforçados com nanocristais de batata, mandioca e milho*



## RESUMO

Nanocristais de amido (NCA) são obtidos da hidrólise ácida do amido granular, quando as áreas amorfas são degradadas e as áreas cristalinas, mais resistentes ao ácido, são liberadas resultando em nanopartículas cristalinas, que devido ao formato e dimensões podem ser aplicadas como reforçadores em matrizes poliméricas biodegradáveis. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades de barreiras e mecânicas de biofilmes à base de amido adicionados de NCA de batata, mandioca e milho obtidos em diferentes tempos de hidrólise. NCA, obtidos após hidrólise com  $H_2SO_4$  dos amidos de batata por 5 (BA5) e 7 (BA7) dias e de mandioca e milho por 3 (MA3 e MI3), 5 (MA5 e MI5) e 7 (MA7 e MI7) dias, foram utilizados nas concentrações de 0 (controle), 1, 3 e 5% em filmes à base de amido de mandioca. Os NCA de batata tinham formato arredondado, enquanto aqueles de mandioca e milho tinham formato de plaquetas. Umidade, solubilidade, cristalinidade relativa, permeabilidade ao vapor d'água (PVA), propriedades mecânicas e isoterma de adsorção foram avaliadas. Os filmes adicionados de NCA tiveram menores teores de umidade e maior solubilidade, independente da fonte botânica e concentração dos NCA, com exceção daqueles adicionados de NCA de MI3. A adição de NCA de BA5, BA7, MA3, MA5, MI3 e MI5, independente da concentração, causou redução da PVA dos biofilmes melhorando suas propriedades de barreira, enquanto a adição de NCA de MA7 e MI7 causou aumento na PVA devido à aglomeração das partículas. A análise de componentes principais permitiu agrupar as amostras de acordo com as propriedades mecânicas. Os filmes adicionados de NCA 3%BA5, 5%BA7, 3%MA5, 1%MI3 e 5%MI3 se destacaram dos demais por apresentarem melhores propriedades de barreiras e mecânicas. Esses filmes tiveram alta resistência à tração e módulo de Young e baixa elongação. O formato das partículas não influenciou as propriedades mecânicas dos biofilmes, no entanto, a dispersão das partículas na matriz polimérica e a estabilidade das superfícies dos cristais melhoraram as forças de tensão. Os NCA de MI3 na concentração de 1% foram os mais adequados para serem aplicados em filmes à base de amido de mandioca.

**Palavras-chave:** nanopartículas, amido termoplástico, propriedades de barreira, propriedades mecânicas

## 1. INTRODUÇÃO

Polímeros petroquímicos são predominantemente usados em materiais para embalagens devido a seu baixo custo, fácil processamento e boas propriedades de barreiras (GARCÍA et al., 2009). No entanto, o grande impacto ambiental causado por esses materiais plásticos tem contribuído para o desenvolvimento de materiais que se degradem mais rapidamente no ambiente. Polímeros derivados de processos biotecnológicos e microbiológicos têm sido desenvolvidos como uma alternativa para uso em embalagens (MOHANTY; MISRA; DRZAL, 2002), mas seu custo elevado dificulta sua aplicação. Assim, polissacarídeos naturais, como amido, celulose, proteínas e quitina, têm sido pesquisados como alternativas para materiais de embalagens, por serem considerados fontes de recursos totalmente renováveis e de baixo custo. Dentre esses polissacarídeos, o amido é o material mais promissor por ser de baixo custo e totalmente biodegradável.

A maneira usual para processar filmes de amido consiste em convertê-lo em um polímero termoplástico por meio da mistura do polímero com água ou agente plastificante não aquoso, geralmente polióis, como glicerol e sorbitol (LABET; THIELEMANS; DUSFRENE, 2007).

Os filmes à base de amido são transparentes, incolores e inodoros, características desejáveis para embalagens alimentícias, pois as mesmas não podem interagir com o alimento (JIMÉNEZ et al., 2012; MUKURUMBIRA; MELLEN; AMONSOU, 2017). Apesar destas vantagens, esses filmes apresentam propriedades mecânicas restritas quando comparadas àquelas dos filmes à base de polímeros sintéticos. Os filmes de amido apresentam flexibilidade limitada devido às fortes ligações polares do polímero (HULLEMAN et al., 1999). Outra desvantagem é sua natureza hidrófila que torna esses filmes suscetíveis à umidade, modificando sua estabilidade dimensional e suas propriedades mecânicas (GARCÍA et al., 2011). Os plastificantes melhoram as propriedades mecânicas dos filmes de amido, mas os tornam mais suscetíveis à umidade, devido a seu caráter hidrofílico (GARCÍA et al., 2009).

A nanotecnologia envolve a manipulação de materiais em uma escala nanométrica com o objetivo de caracterizar estruturas, dispositivos e produtos derivados

das nanoestruturas (DE AZEREDO, 2009). A aplicação da nanotecnologia em polímeros pode abrir novas possibilidades para melhorar, não apenas as suas propriedades estruturais, mas também a relação custo e eficiência (SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007). Os compósitos poliméricos são misturas de polímeros com agentes de enchimento inorgânicos ou orgânicos que têm pelo menos uma das dimensões em escala nanométrica (nanopartículas) (DE AZEREDO, 2009).

Os nanocristais de amido (NCA) podem ser obtidos após extensiva hidrólise ácida dos grânulos em temperatura menor que a temperatura de gelatinização. Durante a hidrólise as regiões amorfas são degradadas, enquanto as regiões cristalinas são liberadas (PUTAUX et al., 2003; ANGELLIER-COUSSY et al., 2009). Putaux et al. (2003) identificaram a morfologia dos NCA, quando trabalharam com amido de milho ceroso submetido à hidrólise ácida com ácido sulfúrico. Esses autores verificaram que esses NCA exibiam formatos de plaqueta e dimensões de 20-40 nm de largura e 15-30 nm de comprimento, exibindo ângulo de 60-65°.

Os NCA têm recebido muita atenção devido, principalmente, à sua escala nanométrica. Estas partículas cristalinas apresentam propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas distintas por possuírem grande área superficial. Os NCA têm sido considerados materiais promissores para serem utilizados como reforço em biofilmes, pois a dispersão uniforme das nanopartículas conduz a uma área interfacial com carga muito grande entre a matriz e o agente de enchimento que altera a mobilidade molecular, melhorando as propriedades mecânicas e de barreira dos biofilmes (DE AZEREDO, 2009).

Os NCA de amido de milho ceroso têm sido muito utilizados em matrizes poliméricas à base de amido (ANGELLIER et al., 2006; VIGUIE; MOLINA-BOISSEAU; DUFRESNE, 2007; KRISTO; BILIADERIS, 2007; GARCIA et al., 2009; GARCÍA et al., 2009; LI et al., 2015). Nestes estudos foi verificado que as nanoestruturas de milho ceroso reduziram a permeabilidade ao vapor d'água e aumentaram a resistência à tração e o Módulo de Young, além de reduzirem a elongação dos filmes. Em trabalhos mais recentes, outras fontes botânicas foram utilizadas para obtenção das nanopartículas a serem usadas como reforçadores em biofilmes, como amidos de milho regular (SHI et al., 2013), taro (DAI et al., 2015), mandioca (TEODORO et al., 2015),

arroz (PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013) e tubérculos de *amadumbe* (MUKURUMBIRA; MELLEEM; AMONSOU, 2017). Esses estudos também mostraram que os NCA melhoraram as propriedades mecânicas dos filmes à base de amido.

Os NCA apresentam características diferentes dependendo da fonte botânica do amido de origem e do tempo de hidrólise. Como descrito no Capítulo II deste trabalho, a morfologia e o tamanho dos NCA está relacionada com o padrão cristalino. NCA de milho e mandioca exibiram alta cristalinidade e formatos definidos a partir do terceiro dia de hidrólise, enquanto essas características só foram observadas nos NCA de batata no quinto dia. NCA de mandioca exibiram formato quadrado no terceiro dia e a partir do quinto dia exibiram formato de plaquetas, enquanto os NCA de milho e batata exibiram formato de plaqueta e arredondados, respectivamente, independente do tempo de tratamento. A caracterização de filmes à base de amido adicionados de NCA obtidos em diferentes tempos de hidrólise, até o momento não foram relatados. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades de barreiras e mecânicas de filmes de amido de mandioca adicionados de NCA de batata, mandioca e milho obtidos em função do tempo de hidrólise.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Amidos de batata (cultivar IAC Ibituaçu), mandioca (cultivar Cascudinha) e milho (cultivar IPR 114) previamente isolados no laboratório como descrito no Capítulo II foram utilizados. Todos os reagentes utilizados foram puros para análise.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Preparo dos Nanocristais de Amido**

Os amidos de mandioca e milho foram hidrolisados durante 3, 5 e 7 dias e o amido de batata durante 5 e 7 dias com 3,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 40°C em banho com agitação

constante de 100 rpm. (ANGELLIER-COUSSY et al., 2009). Após hidrólise, as suspensões foram lavadas com água deionizada até próximo a neutralidade (pH ~6,8) e então liofilizadas para obtenção dos nanocristais (NCA).

#### 2.2.1.1. Tamanho das nanopartículas

O tamanho dos NCA foi determinado no Zetasizer (modelo nanoseries, Malvern, Worcestershire, Inglaterra) seguindo o método de LeCorre, Bras e Dufresne (2011). Suspensões de nanopartículas (0,4% p/v) em água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) foram filtradas em filtro 0,22 μm (Millipore) e colocadas em banho de ultrassom por 150 s para dispersar as partículas aglomeradas. Foram retiradas alíquotas de 1 mL da suspensão e colocadas diretamente em cubeta específica do equipamento. O tamanho das partículas da amostra foi determinado em cinco repetições a 25 °C, os dados foram analisados usando o *software* Zetasizer (Malvern, Worcestershire, Inglaterra). A distribuição do tamanho dos NCA foi obtida a partir da medida mais significativa em um determinado tempo e velocidade de varredura.

#### 2.2.2. Testes preliminares dos biofilmes

Os primeiros testes de biofilmes foram realizados com amido de milho e mandioca seguindo o procedimento de Li et al. (2015). Foram adicionados 0,5%, 1%, 3% e 5% de NCA de milho obtidos após três dias de hidrólise ácida à solução filmogênica. A espessura, as propriedades mecânicas (2.2.3.5) e a difração de raios-X (2.2.3.6) foram determinadas nos filmes.

#### 2.2.3. Processamento dos biofilmes

O biofilme à base do amido de mandioca foi preparado pela técnica de *casting*, usando 3 g de amido de mandioca, 0,9 g de glicerol (30% p/p) e 100 mL de água deionizada. A solução foi agitada por 15 min em temperatura ambiente. Após este período, a solução filmogênica foi agitada a 75 °C por 5 min e resfriada até 40 °C. NCA

de batata obtidos após 5 (BA5) e 7 (BA7) dias de hidrólise e NCA de mandioca e milho obtidos após 3 (MA3 e MI3), 5 (MA5 e MI5) e 7 (MA7 e MI7) dias de hidrólise nas concentrações de 0 (controle), 1, 3, e 5% em relação ao peso do amido, foram dispersadas em 50 mL de água destilada e colocadas em banho de ultrassom por 10 min. Após tratamento com ultrassom, as dispersões de NCA foram adicionadas à solução filmogênica a 40 °C e a mesma foi agitada por 30 min. As soluções filmogênicas controle e com diferentes concentrações de NCA foram despejadas em placas moldadas de politetrafluoretileno (19 cm x 19 cm), na proporção de 9,7 mg/cm<sup>2</sup> de sólidos e secas a 35 °C por 10 h. Após secagem, os filmes foram retirados das placas e mantidos em dessecador a 25 °C (solução saturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, UR 53%) por 7 dias antes das análises.

#### *2.2.3.1. Espessura*

A espessura dos biofilmes foi determinada usando um micrômetro digital (Mitutoyo, São Paulo, Brasil). As medidas foram realizadas em 10 posições aleatórias dos biofilmes. O desvio padrão médio dos biofilmes foi de aproximadamente 5% de espessura média (MALI et al., 2002).

#### *2.2.3.2. Umidade*

A umidade dos biofilmes foi determinada de acordo com o método gravimétrico. Os biofilmes secos foram cortados nas dimensões de 20 mm x 20 mm e condicionados a UR 53% a 25 °C por sete dias (BOD). As amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 105 °C por 24 h. Os testes foram realizados em triplicata.

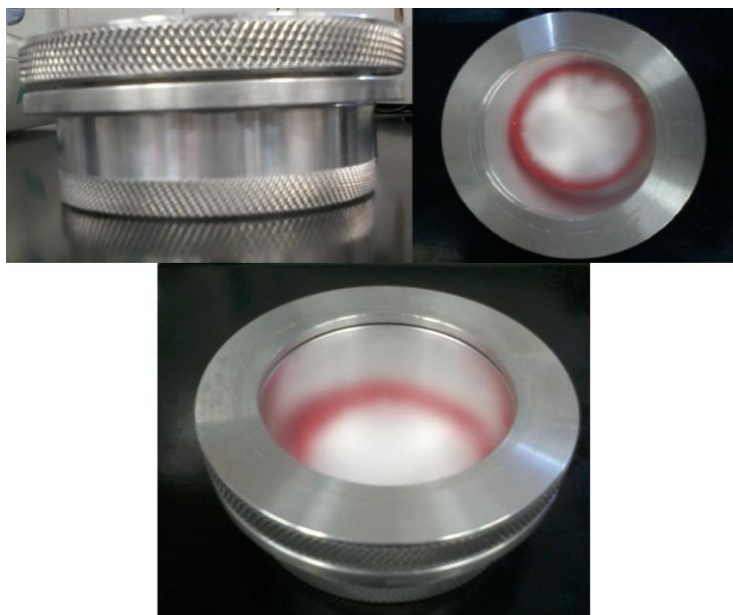
#### *2.2.3.3. Solubilidade*

A solubilidade dos biofilmes foi determinada seguindo o procedimento de Olivato et al. (2012) com pequenas modificações. Os filmes foram cortados nas dimensões 20 mm x 20 mm e secos em cloreto de cálcio anidro (UR 0%) por 72 h ou

até atingir peso constante. Os filmes foram imersos em água deionizada (50 mL) por 48 h a 25 °C. As amostras foram removidas e secas a 105 °C por 4 h. O peso da amostra condicionada após o tratamento foi utilizado para determinar a % de perda de peso em água.

#### 2.2.3.4. Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes foi determinada de acordo com American Society for Testing and Materials (ASTM) E96-85 (1985) com adaptações. Amostras circulares de filmes (0.2827 m<sup>2</sup>) foram colocadas sob a tampa de um molde de alumínio (Figura 1) contendo ¾ de cloreto de cálcio anidro (0% de UR) e rosqueadas. O molde foi condicionado a 25 °C em um dessecador contendo água (100% UR) e um ventilador em miniatura (para constante circulação de ar). O ganho de peso do filme foi medido a cada 2 h por 30 h. A alteração do peso do filme foi representada graficamente em função do tempo.



**Figura 1** – Cápsulas utilizadas na permeabilidade ao vapor d'água.

A PVA foi calculada a partir da inclinação (G/t) e a área do molde de alumínio (m<sup>2</sup>) usando a equação (1).

$$WVP = \frac{G \cdot e}{t \cdot A \cdot \Delta P} \quad (1)$$

Onde:  $G/t$  é a inclinação da reta obtida pela regressão linear do ganho de massa (g) em função do tempo (s);  $A$  é a área exposta ( $m^2$ ) de cada filme;  $e$  é a espessura de cada filme (m);  $t$  é o intervalo de tempo para permeação (h) e  $\Delta P$  é a diferença entre a pressão atmosférica (kPa) e o cloreto de cálcio e o ambiente saturado com água destilada (0,12 kPa).

#### 2.2.3.5. *Cristalinidade relativa*

A cristalinidade relativa dos biofilmes foram determinadas em difractômetro de raios-X de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação monocromática de Cu, linha K,  $L = 1,542 \text{ \AA}$ , utilizando porta amostra vazado nas dimensões de 4 mm x 4 mm. As amostras foram analisadas de  $3^\circ$  a  $40^\circ$  em  $2\theta$  com velocidade de varredura de  $1^\circ/\text{min}$  e as condições de uso foram 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas (NARA; KOMIYA, 1983). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 2.2.3.6. *Propriedades mecânicas*

Os testes de resistência mecânica foram realizados com o texturômetro TA.TX Plus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra), de acordo com a norma ASTM D882-12 (2012). As tiras retangulares (25 x 50 mm) foram previamente cortadas e acondicionadas a 50% de UR a  $20^\circ\text{C}$ , por no mínimo 48 h. Essas tiras foram colocadas entre as garras que apresentavam separação inicial de 30 mm. A velocidade durante os testes foi fixada em  $0,8 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . O limite de resistência à tração foi calculado dividindo a força máxima obtida pela área original da amostra (de acordo com sua espessura mínima).



### 2.2.3.7. Isoterma de sorção

As isotermas de sorção dos filmes foram determinadas em diferentes umidades relativas (LiCl= 11,8%; MgCl<sub>2</sub>= 32,8%; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>= 43,2; NaBr= 57,6%; NaNO<sub>2</sub>= 64,5%; NaCl= 75,3%; KCl= 84,3%; BaCl<sub>2</sub>= 90,4%). Os filmes cortados (20 X 20 mm) foram condicionados em cloreto de cálcio anidro (0% UR) a 25 °C durante 72 horas. Posteriormente os filmes foram colocados em recipientes fechados contendo soluções salinas saturadas para obter a UR desejada. Os recipientes foram armazenados em câmaras de climatização BOD a 25 °C. Os filmes condicionados foram pesados em períodos periódicos de tempo até as amostras entrarem em equilíbrio com o ambiente, cujo critério se baseou na variação de peso, que expresso em base seca, não deveria exceder 0,001 g/g de sólidos secos em um período de 72 h. A umidade absoluta (base seca) foi determinada em estufa a vácuo a 70 °C por 4 h. Todos os testes foram conduzidos em triplicata. Os resultados foram ajustados pelo modelo de GAB (Guggeenheim, Anderson e de Boer) utilizando programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2007), equação 2, cujos parâmetros dos modelos não lineares foram estimados pelo critério dos mínimos quadrados, com base no algoritmo de Levenberg-Marquardt (MARQUARDT, 1963).

$$X_w = \frac{C.k.m_o.a_w}{[(1 - k.a_w)(1 - k.a_w + C.k.a_w)]} \quad (2)$$

Onde: **C** (calor de sorção da monocamada), **k** (calor de sorção da multicamada) e **m<sub>o</sub>** (monocamada dada em g água/g sólidos) são parâmetros dos modelos, **X<sub>w</sub>** é a umidade em base seca (g água/g sólidos) e **a<sub>w</sub>** é a UR/100.

### 2.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicata, com exceção das propriedades mecânicas que foram realizadas no mínimo com cinco repetições. Os dados foram

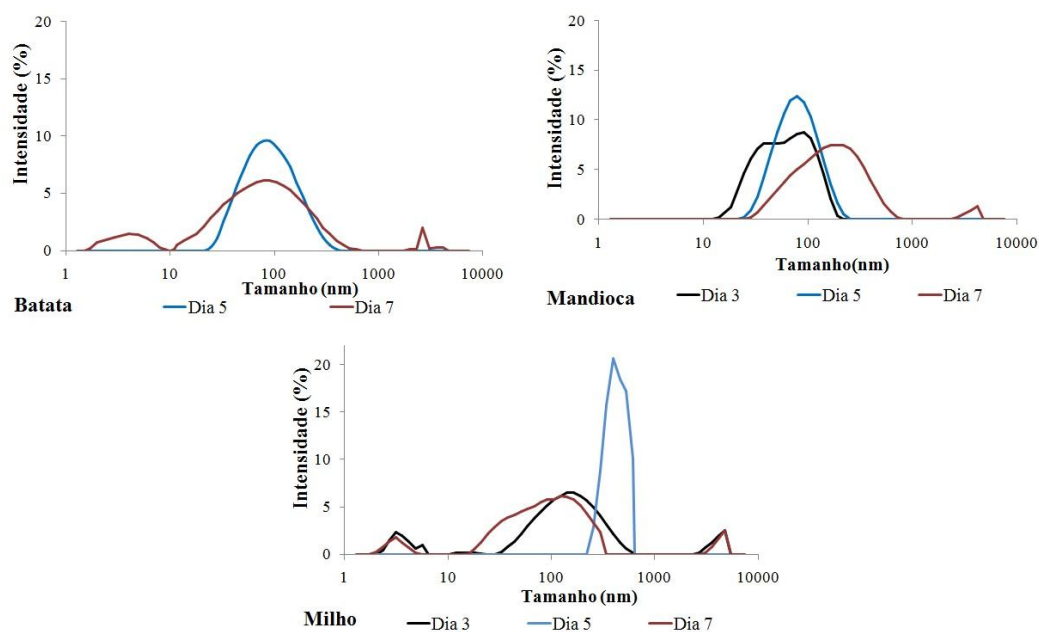
avaliados usando o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2007) incluindo a análise de variância (ANOVA) e a análise de comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada com a matriz de correlação e sem rotação fatorial. As propriedades mecânicas (resistência à tração, módulo de Young e alongação na quebra) foram fixadas em colunas (variáveis) e os filmes adicionados de NCA em linhas (amostras), e os dados foram padronizados antes da análise.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Tamanho das partículas

O tamanho das partículas foi determinado a partir da suspensão de NCA utilizando *Zetasizer*. Este sistema determina o tamanho mensurando primeiro o movimento *Browniano* das partículas usando espalhamento de luz dinâmico, com isso o tamanho aparente das partículas hidratadas pode ser estimado (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011). A distribuição do tamanho das partículas nas suspensões de NCA está apresentada na Figura 2. No terceiro dia de hidrólise os NCA de mandioca exibiram uma distribuição bimodal com picos próximos em 33 e 122 nm, enquanto os NCA de milho exibiram uma distribuição trimodal, com picos em 4 nm, 190 nm e 3580 nm.

Os NCA de batata e mandioca hidrolisados por cinco dias exibiram picos próximos a 79 nm, confirmando a redução do tamanho das partículas de mandioca, enquanto os NCA de milho tiveram aumento do tamanho das partículas (picos em 459 nm) devido à aglomeração dos cristais. Finalmente, no sétimo dia, os NCA de batata e milho exibiram uma distribuição trimodal (picos em 4 nm, 79-122 nm e 2305-3580 nm), enquanto os NCA de mandioca apresentaram uma distribuição bimodal (295 nm e 3580 nm). Todos os NCA exibiram intensa aglomeração de partículas com o aumento do tempo de hidrólise. A aglomeração das partículas ocorre, principalmente, devido às forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas dos NCA que são mais fortes que a força de repulsão (WEI et al., 2014).



**Figura 2** – Distribuição do tamanho da solução de NCA de batata, mandioca e milho.

### 3.2. Testes preliminares

Nos testes preliminares NCA de MI3 foram aplicados em filmes de amido de milho e de mandioca, nas concentrações de 0,5, 1, 3 e 5%, as quais foram baseadas na literatura (LI et al., 2015; TEODORO et al., 2015). O amido de milho utilizado como matriz polimérica não foi adequado para a adição de NCA em função da alta taxa de retrogradação deste amido (capítulo II) que já contribuiu para a cristalinidade relativa do biofilme. Estas características prejudicaram as propriedades mecânicas, pois os filmes foram mais quebradiços e suscetíveis a rompimentos. Os filmes de amido de mandioca adicionados de NCA foram mais adequados, pois os mesmos apresentaram superfície homogênea e foram facilmente removidos do suporte após secagem. Estas características estavam relacionadas com a baixa taxa de retrogradação do amido de mandioca (Capítulo II).

### 3.3. Características dos biofilmes adicionados de NCA

#### 3.3.1. Espessura, umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água

A espessura dos filmes é um parâmetro muito importante para o controle e avaliação do material, pois influencia principalmente as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor d'água (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Neste estudo, filmes com espessuras mais finas (~ 0,100 mm, Tabela 1) foram produzidos com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de NCA. No estudo realizado para avaliar a microestrutura dos filmes de amido de inhame plastificado com glicerol, Mali et al. (2002) obtiveram filmes com espessura média de 0,07 mm. Machado et al. (2014) também observaram que a espessura dos filmes de mandioca adicionados de nanopartículas de coco verde variaram de 0,096 a 0,147 mm. As pequenas diferenças de espessura observadas nos filmes adicionados de NCA (Tabela 1) podem ter ocorrido em função da mobilidade e tendência da aglomeração das nanopartículas na etapa da secagem.

A umidade dos filmes adicionados de NCA variou de 10,98 a 18,71% (Tabela 1). Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) também observaram que o teor de umidade variou de 9,3 a 16,7% em filmes de amido de tubérculo *amadumbe* e de batata adicionados de NCA de *amadumbe*. Os filmes adicionados de NCA de BA7, MA3 e MA5 apresentaram menor teor de umidade, independente da concentração utilizada, enquanto nos filmes adicionados de NCA de BA5, MI3 e MI7 a umidade reduziu a partir da concentração de 3%, e nos filmes adicionados de NCA de MI5, ela reduziu na concentração de 5%. Os filmes de NCA de MA7 apresentaram baixa umidade com 1% e com o aumento da concentração houve aumento no teor de umidade, principalmente na concentração de 3%. De forma geral, houve redução da umidade dos biofilmes com a adição de NCA, independente do tipo ou concentração de NCA, sugerindo que as nanopartículas atuaram como uma barreira reduzindo a absorção de água pelo filmes.

**Tabela 1** – Espessura, umidade e solubilidade filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações.

Tipo de NCA	Concentração (%)	Espessura (mm)	Umidade (%)	Solubilidade (%)
Controle	0	0,109 ± 0,010	18,71 ± 0,91 <sup>a</sup>	27,57 ± 1,00 <sup>f</sup>
BA5	1%	0,101 ± 0,005	16,50 ± 0,90 <sup>abcd</sup>	37,98 ± 0,75 <sup>abcd</sup>
	3%	0,119 ± 0,010	14,47 ± 0,37 <sup>defgh</sup>	41,78 ± 2,58 <sup>ab</sup>
	5%	0,116 ± 0,003	16,43 ± 1,79 <sup>abcde</sup>	34,37 ± 0,84 <sup>de</sup>
BA7	1%	0,109 ± 0,004	13,28 ± 0,78 <sup>fghi</sup>	33,61 ± 0,84 <sup>e</sup>
	3%	0,116 ± 0,007	14,62 ± 0,39 <sup>defgh</sup>	37,39 ± 1,19 <sup>bcde</sup>
	5%	0,113 ± 0,031	15,19 ± 0,30 <sup>defgh</sup>	34,84 ± 1,10 <sup>de</sup>
MA3	1%	0,097 ± 0,004	13,96 ± 0,43 <sup>efgh</sup>	36,89 ± 1,02 <sup>cde</sup>
	3%	0,106 ± 0,004	12,81 ± 0,53 <sup>hi</sup>	40,44 ± 1,23 <sup>abc</sup>
	5%	0,104 ± 0,007	10,98 ± 0,22 <sup>i</sup>	40,47 ± 1,52 <sup>abc</sup>
MA5	1%	0,083 ± 0,004	13,15 ± 0,42 <sup>ghi</sup>	37,87 ± 1,90 <sup>abcde</sup>
	3%	0,113 ± 0,006	13,22 ± 0,44 <sup>ghi</sup>	37,56 ± 1,56 <sup>bcde</sup>
	5%	0,093 ± 0,002	14,23 ± 0,40 <sup>efgh</sup>	37,14 ± 1,34 <sup>bcde</sup>
MA7	1%	0,096 ± 0,005	14,00 ± 0,50 <sup>efgh</sup>	36,61 ± 0,67 <sup>cde</sup>
	3%	0,093 ± 0,004	18,03 ± 0,71 <sup>abc</sup>	34,61 ± 0,56 <sup>de</sup>
	5%	0,095 ± 0,008	15,95 ± 0,80 <sup>bcdef</sup>	34,76 ± 0,60 <sup>de</sup>
MI3	1%	0,099 ± 0,005	16,91 ± 0,09 <sup>abcd</sup>	27,71 ± 1,29 <sup>f</sup>
	3%	0,101 ± 0,003	14,50 ± 1,09 <sup>defgh</sup>	27,67 ± 0,61 <sup>f</sup>
	5%	0,099 ± 0,003	13,28 ± 0,45 <sup>fghi</sup>	26,27 ± 0,16 <sup>f</sup>
MI5	1%	0,091 ± 0,003	16,60 ± 0,60 <sup>abcd</sup>	36,10 ± 0,57 <sup>de</sup>
	3%	0,108 ± 0,007	18,50 ± 0,28 <sup>ab</sup>	35,65 ± 0,13 <sup>de</sup>
	5%	0,112 ± 0,005	15,02 ± 0,80 <sup>defgh</sup>	37,15 ± 1,53 <sup>bcde</sup>
MI7	1%	0,101 ± 0,005	17,95 ± 0,82 <sup>abc</sup>	35,81 ± 0,73 <sup>de</sup>
	3%	0,103 ± 0,007	15,00 ± 0,14 <sup>defgh</sup>	35,57 ± 0,69 <sup>de</sup>
	5%	0,113 ± 0,005	15,72 ± 0,78 <sup>cdefg</sup>	42,30 ± 2,37 <sup>a</sup>

\*Médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). BA5 e BA7: NCA de batata obtidos após cinco e sete dias de hidrólise. MA3 e MA5: NCA de mandioca obtidos após três e cinco dias de hidrólise. MI3 e MI5: NCA de milho obtidos após três e cinco dias de hidrólise.

A solubilidade em água é um dos principais parâmetros dos biofilmes para definir sua aplicação. Alguns usos potenciais requerem que os filmes sejam insolúveis em água para aumentar a integridade do produto embalado. Entretanto, em outras aplicações, como no encapsulamento de alimentos ou aditivos, a solubilidade em água dos filmes antes do consumo do produto pode ser útil (SLAVUTSKY; BERTUZZI,

2014). De forma geral, os filmes controle e adicionados de NCA apresentaram baixa solubilidade em água, 26,17% a 41,78%, quando comparados com filmes à base de isolados de proteínas (CONDÉS et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A adição de NCA provocou aumento de ~10% na solubilidade em água dos biofilmes, independente da fonte botânica e da concentração, com exceção da adição de NCA de MI3 que não interferiu na solubilidade dos filmes. O aumento da concentração de NCA de BA5 e BA7 causou redução da solubilidade dos biofilmes, enquanto esta aumentou nos filmes adicionados de NCA de MA3, MI5 e MI7 e não se alterou naqueles adicionados de NCA de MA5 e MA7. Condés et al. (2015) e Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) verificaram que os NCA de milho normal e ceroso em filmes de proteína de amaranto e NCA de *amadumbe* em filmes de amido de *amadumbe* e de batata, respectivamente não tiveram efeito significativo na solubilidade em água dos filmes. Por outro lado, Silva, Pereira e Druzian (2012), Slavutsky e Bertuzzi (2014) e Jiang et al. (2016) observaram que a adição de nanopartículas de amido e nanocristais de celulose provocaram redução deste parâmetro. Essa variação de comportamento está relacionada com a superfície reativa das nanopartículas que torna os filmes mais ou menos suscetíveis à água.

A permeabilidade ao vapor d'água é um dos principais parâmetros de avaliação dos filmes, pois está diretamente relacionada com o armazenamento e conservação dos alimentos. A adição de NCA causou variação significativa na PVA dos filmes (Tabela 2).

De forma geral a adição de NCA de BA5, BA7, MA3, MA5, MI3 e MI5, independente da concentração, provocou redução na PVA melhorando as propriedades de barreiras desses filmes. Piyada, Waranyou e Thawien (2013), Li et al. (2015), Teodoro et al. (2015) e Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) também observaram melhora das propriedades de barreira dos filmes adicionados de NCA. Teodoro et al. (2015) reportaram que as nanopartículas tornam os filmes mais compactos, reduzindo o caminho livre para transportar o vapor d' água através do filme, reduzindo a ligação de hidrogênio entre a água e a matriz polimérica.

Por outro lado, houve aumento significativo da PVA nos filmes adicionados de NCA de MA7 e MI7, independente da concentração, e BA5 na concentração de 5%,

indicando que a intensa aglomeração de partículas desses NCA (Figura 2) piorou as propriedades de barreira ao vapor d' água do material. As partículas aglomeradas podem formar nanofios nos filmes com altas concentrações de hidroxilas, formando um caminho preferencial para a difusão do vapor d' água através desses fios, aumentando a permeabilidade dos filmes (GARCÍA et al., 2011).

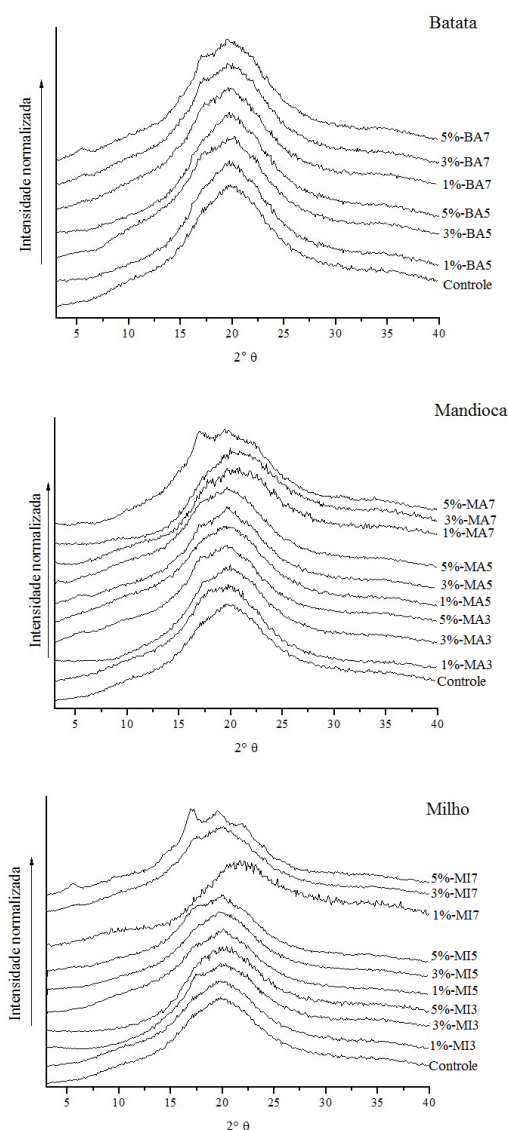
**Tabela 2** – Permeabilidade ao vapor d' água dos filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações.

Tipo de NCA	Concentração (%)	PVA (g/m.h.Pa)
Controle	0	$1,27 \times 10^{-7} \pm 0,01^{efgh}$
BA5	1%	$8,98 \times 10^{-8} \pm 0,00^{mno}$
	3%	$1,07 \times 10^{-7} \pm 0,00^{ijkl}$
	5%	$1,30 \times 10^{-7} \pm 0,01^{bdefg}$
BA7	1%	$1,03 \times 10^{-7} \pm 0,01^{ijkl}$
	3%	$1,15 \times 10^{-7} \pm 0,01^{ghij}$
	5%	$1,08 \times 10^{-7} \pm 0,01^{hijk}$
MA3	1%	$1,23 \times 10^{-7} \pm 0,00^{fghi}$
	3%	$9,77 \times 10^{-8} \pm 0,00^{lmno}$
	5%	$9,72 \times 10^{-8} \pm 0,00^{lmno}$
MA5	1%	$8,08 \times 10^{-8} \pm 0,00^p$
	3%	$1,25 \times 10^{-7} \pm 0,01^{defg}$
	5%	$8,42 \times 10^{-8} \pm 0,00^{op}$
MA7	1%	$1,39 \times 10^{-7} \pm 0,01^{cde}$
	3%	$1,42 \times 10^{-7} \pm 0,00^{bcd}$
	5%	$1,36 \times 10^{-7} \pm 0,01^{def}$
MI3	1%	$9,82 \times 10^{-8} \pm 0,0^{lmn}$
	3%	$9,77 \times 10^{-8} \pm 0,00^{lmno}$
	5%	$1,16 \times 10^{-7} \pm 0,00^{ghij}$
MI5	1%	$9,97 \times 10^{-8} \pm 0,00^{klm}$
	3%	$8,48 \times 10^{-8} \pm 0,00^{nop}$
	5%	$9,94 \times 10^{-8} \pm 0,00^{klmn}$
MI7	1%	$1,47 \times 10^{-7} \pm 0,01^{bc}$
	3%	$1,53 \times 10^{-7} \pm 0,01^b$
	5%	$1,74 \times 10^{-7} \pm 0,01^a$

\*Médias  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). BA5 e BA7: NCA de batata obtidos após cinco e sete dias de hidrólise. MA3 e MA5: NCA de mandioca obtidos após três e cinco dias de hidrólise. MI3 e MI5: NCA de milho obtidos após três e cinco dias de hidrólise.

### 3.3.2. Cristalinidade dos filmes

Os difratogramas de raios-X dos filmes controle e adicionados de NCA exibiram picos em 17 e 22 ° em  $2\theta$  (Figura 3) que são característicos do padrão tipo B. Os filmes à base de amido exibem esses picos em função da retrogradação do amido durante o condicionamento dos mesmos, já que amidos retrogradados exibem padrão cristalino tipo B. Os NCA de mandioca e milho adicionados aos filmes tinham padrão cristalino tipo A (Capítulo II), mas a concentração utilizada não foi suficiente para interferir no padrão cristalino do biofilme.



**Figura 3** – Difratogramas de raios-X dos filmes adicionados de NCA.



De um modo geral, houve aumento da cristalinidade relativa (CR) dos filmes com a adição de NCA à matriz polimérica (Tabela 3), independente da fonte botânica. O aumento da concentração de NCA causou aumento da CR dos biofilmes. Esses resultados indicam que o processamento dos biofilmes não provocou degradação dos NCA (KRISTO; BILIADERIS, 2007; PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013).

**Tabela 3** – Cristalinidade relativa dos filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações.

Tipo de NCA	Concentração (%)	Cristalinidade Relativa (%)
Controle	0	19,0
BA5	1%	21,0
	3%	21,5
	5%	22,7
BA7	1%	21,8
	3%	22,8
	5%	23,1
MA3	1%	24,0
	3%	24,8
	5%	24,9
MA5	1%	23,5
	3%	26,6
	5%	28,1
MA7	1%	21,7
	3%	22,3
	5%	28,3
MI3	1%	25,7
	3%	24,1
	5%	23,2
MI5	1%	22,0
	3%	26,4
	5%	27,1
MI7	1%	23,1
	3%	23,5
	5%	28,5

BA5 e BA7: NCA de batata obtidos após cinco e sete dias de hidrólise. MA3 e MA5: NCA de mandioca obtidos após três e cinco dias de hidrólise. MI3 e MI5: NCA de milho obtidos após três e cinco dias de hidrólise.

### 3.3.3. Propriedades mecânicas

As embalagens de alimentos devem ser resistentes à ruptura para proteger a integridade e facilitar o manejo dos alimentos e flexíveis para que possam se adaptar às deformações sem comprometer o conteúdo interno (MALI et al., 2002). Nos ensaios de tração dos filmes nanocompósito amido/NCA foram determinadas resistência à tração (RT), alongação na ruptura e o módulo de Young (MY) (Tabela 4).

A adição de NCA influenciou significativamente as propriedades mecânicas dos filmes à base de amido de mandioca. De forma geral, a adição de NCA reduziu significativamente a alongação em relação ao filme puro de amido, tornando os filmes menos flexíveis.

A adição de 1% de NCA de BA5 não alterou as propriedades mecânicas dos filmes, enquanto o aumento na concentração de NCA de BA5 e BA7 causaram melhora da RT em relação ao filme controle. Os NCA de BA5 exibiram uma distribuição homogênea de partículas, enquanto os NCA de BA7 exibiram uma distribuição heterogênea (Figura 2), indicando que com o aumento do tempo de hidrólise o tamanho das partículas foi reduzindo e as partículas foram formando aglomerados em alguns pontos dos biofilmes, com isso o filme adicionado de NCA de BA5 na concentração de 3% apresentou maior RT do que o filme adicionado de NCA de BA7 na concentração de 5%. Jiang et al. (2016) descreveram que a ligação interfacial entre o material de enchimento e a matriz permite a transferência efetiva de tensões da matriz para nanopartículas, o que pode transportar eficientemente a carga e assim aumentar a resistência do compósito.

Os filmes adicionados de NCA de MA3 apresentaram baixa resistência mecânica e alta alongação que o filme controle, o aumento da concentração reduziu a RT e o MY e tornou os filmes mais elásticos. Os NCA MA3 apresentaram formatos quadrados e distribuição de partículas mais heterogêneas que pode ter influenciado para menor interação com a matriz do amido. Por outro lado, os NCA de MA5 e MA7 exibiram formato de plaquetas e distribuição de partículas mais uniformes (Capítulo II). Os filmes adicionados de 1% e 3% de NCA de MA5 apresentaram RT de ~5,2 MPa, enquanto a adição de 3 e 5% de NCA de MA7 provocou aumento de 6,37 e 5,33 MPa,

respectivamente. A aglomeração das partículas de NCA de MA5 em altas concentrações provocou redução da RT e aumento da elongação, mas ainda estes valores eram inferiores àqueles do filme controle.

**Tabela 4** – Propriedades mecânicas de filmes adicionados de NCA de batata, mandioca e milho em diferentes concentrações.

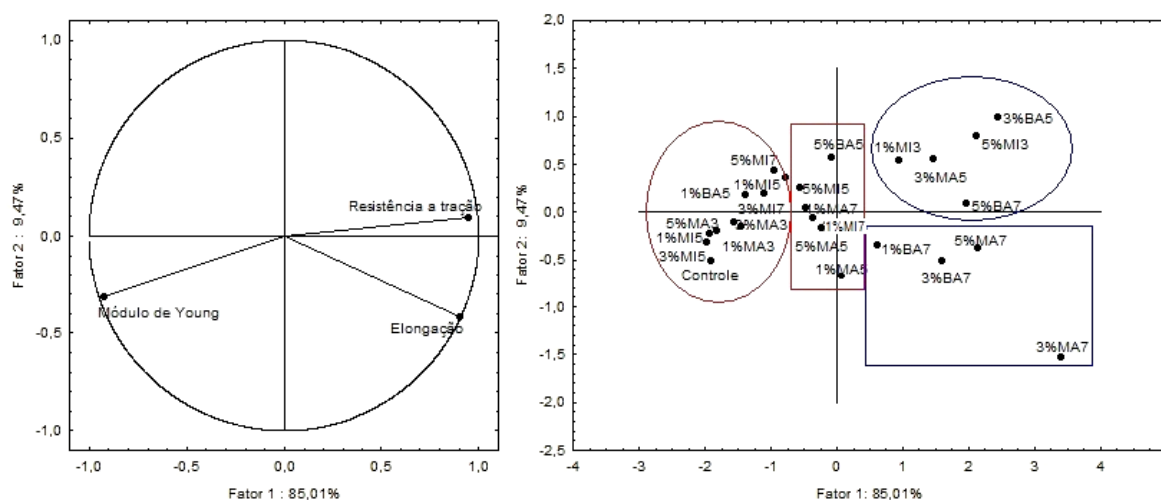
NCA	Concentração (%)	RT (MPa)	ER (%)	MY (MPa)
Controle	0	1,92 ± 0,28 <sup>kl</sup>	238,63 ± 16,29 <sup>a</sup>	4,96 ± 0,60 <sup>ijk</sup>
BA5	1%	1,93 ± 0,20 <sup>lm</sup>	202,52 ± 16,34 <sup>bc</sup>	3,94 ± 0,74 <sup>ijk</sup>
	3%	7,75 ± 1,17 <sup>a</sup>	61,62 ± 18,18 <sup>hi</sup>	40,70 ± 8,86 <sup>de</sup>
	5%	3,08 ± 0,54 <sup>ijk</sup>	117,59 ± 19,55 <sup>fg</sup>	16,45 ± 3,97 <sup>ghij</sup>
BA7	1%	4,24 ± 0,61 <sup>defgh</sup>	140,08 ± 27,61 <sup>ef</sup>	47,16 ± 4,23 <sup>cd</sup>
	3%	4,57 ± 0,64 <sup>cdefg</sup>	98,33 ± 15,54 <sup>gh</sup>	71,95 ± 18,23 <sup>b</sup>
	5%	5,54 ± 0,68 <sup>bc</sup>	75,44 ± 6,70 <sup>hi</sup>	61,82 ± 12,82 <sup>bc</sup>
MA3	1%	2,29 ± 0,31 <sup>lm</sup>	173,51 ± 19,07 <sup>cde</sup>	5,61 ± 0,87 <sup>ijk</sup>
	3%	2,00 ± 0,12 <sup>lm</sup>	200,32 ± 18,30 <sup>bcd</sup>	7,07 ± 1,42 <sup>hijk</sup>
	5%	1,53 ± 0,11 <sup>m</sup>	212,97 ± 13,20 <sup>ab</sup>	1,89 ± 0,45 <sup>k</sup>
MA5	1%	5,10 ± 0,35 <sup>cde</sup>	204,84 ± 25,13 <sup>abc</sup>	37,28 ± 7,35 <sup>def</sup>
	3%	5,32 ± 0,92 <sup>bcd</sup>	79,13 ± 24,46 <sup>hi</sup>	40,92 ± 7,07 <sup>de</sup>
	5%	3,99 ± 0,17 <sup>efghi</sup>	175,92 ± 15,76 <sup>cde</sup>	24,51 ± 3,17 <sup>efgh</sup>
MA7	1%	3,67 ± 0,45 <sup>ghi</sup>	173,95 ± 20,28 <sup>cde</sup>	15,99 ± 2,24 <sup>ghijk</sup>
	3%	6,37 ± 0,59 <sup>b</sup>	78,28 ± 12,11 <sup>hi</sup>	126,98 ± 31,51 <sup>a</sup>
	5%	5,33 ± 0,90 <sup>bcd</sup>	79,67 ± 14,97 <sup>hi</sup>	77,15 ± 13,51 <sup>b</sup>
MI3	1%	4,83 ± 0,36 <sup>cde</sup>	98,14 ± 15,65 <sup>gh</sup>	31,96 ± 2,07 <sup>defg</sup>
	3%	3,78 ± 0,49 <sup>fghi</sup>	174,46 ± 10,86 <sup>cde</sup>	20,36 ± 3,02 <sup>fghi</sup>
	5%	6,28 ± 0,84 <sup>b</sup>	55,03 ± 13,05 <sup>i</sup>	45,50 ± 3,37 <sup>cd</sup>
MI5	1%	1,28 ± 0,03 <sup>m</sup>	214,54 ± 10,61 <sup>ab</sup>	1,36 ± 0,30 <sup>k</sup>
	3%	1,42 ± 0,13 <sup>m</sup>	223,27 ± 12,60 <sup>ab</sup>	1,75 ± 0,30 <sup>k</sup>
	5%	3,48 ± 0,44 <sup>hij</sup>	166,43 ± 11,85 <sup>de</sup>	10,58 ± 1,52 <sup>hijk</sup>
MI7	1%	2,64 ± 0,17 <sup>jkl</sup>	155,76 ± 14,91 <sup>e</sup>	7,39 ± 1,04 <sup>hijk</sup>
	3%	1,60 ± 0,21 <sup>lm</sup>	174,58 ± 26,07 <sup>cde</sup>	2,73 ± 0,53 <sup>jk</sup>
	5%	1,76 ± 0,43 <sup>lm</sup>	143,04 ± 21,81 <sup>ef</sup>	6,63 ± 0,67 <sup>ijk</sup>

\*Médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). RT: Resistência a tração; MY: Módulo de Young. BA5 e BA7: NCA de batata obtidos após por cinco e sete dias de hidrólise. MA3 e MA5: NCA de mandioca obtidos após três e cinco dias de hidrólise. MI3 e MI5: NCA de milho obtidos após três e cinco dias de hidrólise.

O aumento da concentração de NCA de MI3 provocou aumento da RT que atingiu 6,28 MPa e redução da elongação, sugerindo que as partículas foram melhores dispersas nesses cristais. Houve redução das propriedades mecânicas com a adição de 1 e 3% de NCA de MI5 tornando os filmes mais elásticos, enquanto a adição de 5% desses NCA aumentou a RT (3,48 MPa), porém os filmes ainda apresentavam alta elasticidade (166,43%). Os filmes com 1% de NCA de MI7 apresentaram baixa RT (2,64 MPa) e alta elongação (155%) e com o aumento da concentração essas características foram mais evidentes. Os NCA de milho exibiram formato definidos e uma distribuição homogênea de partículas desde o terceiro dia de hidrólise e com o aumento do tempo de hidrólise houve aumento da aglomeração das partículas como observado na Figura 2, o que contribuiu para a má distribuição de partículas. A agregação de partículas reduz a área da superfície ativa para interagir com a matriz, o que enfraquece a adesão na interface da matriz compósita (MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017).

A ACP foi aplicada para verificar a relação das amostras entre as propriedades mecânicas (variáveis). Os dois primeiros componentes retiveram 94,48% da variabilidade entre as amostras. O primeiro componente foi formado pela RT e MY que explicou 85,01% da variabilidade inicial entre as amostras. A elongação na ruptura dos filmes formava o segundo componente (Figura 4). Os componentes permitiram a separação de quatro grupos distintos de amostras de acordo com as propriedades mecânicas dos filmes. O grupo I foi formado pelos filmes adicionados de NCA de 3%BA5, 5%BA7, 3%MA5, 1%MI3 e 5%MI3. Este grupo teve como característica propriedades mecânicas superiores aos demais filmes, ou seja, alta RT e MY e baixa elongação, destacando os filmes 5%MI3 e 3%BA5. Estes resultados sugerem que o formato das nanopartículas não influenciou as propriedades mecânicas dos filmes que foram mais influenciadas pela estabilidade das superfícies das partículas. Com o aumento do tempo de hidrólise as partículas tendem a se aglomerar devido à maior quantidade de hidroxilas livres que formam ligações de hidrogênio entre as mesmas (Capítulo II), com isso as superfícies dos NCA ficam menos reativas e diminuem sua estabilidade. O aumento da resistência à tração e do módulo de Young estão

relacionados com a boa dispersão das nanopartículas do amido nos filmes (MA et al., 2008).



**Figura 4** – Análise de componentes principais das propriedades mecânicas dos filmes de amido adicionados de NCA.

O grupo II foi formado pelos filmes adicionados de NCA de 1%BA7, 3%BA7, 5%MA7 e 3%MA7 e o grupo III foi formado pelos NCA de 5%BA5, 1%MA5, 5%MA5, 1%MA7, 3%MI3 e 5%MI5. Estes grupos apresentaram propriedades mecânicas intermediárias com valores de RT inferiores àqueles do grupo I. Os grupos II e III se diferenciaram pela baixa e alta elongação, respectivamente.

O grupo IV foi formado pelos filmes controle e adicionados de NCA de 1%BA5, 1%MA3, 3%MA3, 5%MA3, 1%MI5, 3%MI5, 1%MI7, 3%MI7 e 5%MI7. Esses filmes tiveram baixa RT e MY e alta elongação devido à má distribuição das partículas na matriz polimérica ou pela quantidade insuficiente de partículas adicionadas aos filmes. As nanopartículas adicionadas em pequenas proporções (0,5%) em filmes tendem a dispersar-se na matriz, com isso as interações entre o polímero e as partículas interfaciais impede a libertação de nanopartículas a partir da matriz polimérica (TEODORO et al., 2015).

Os grupos I e II que apresentaram características superiores foram selecionados, uma vez que estes biofilmes apresentaram potencial de aplicação em embalagens de alimentos. Com isso foi determinada a isoterma de sorção.

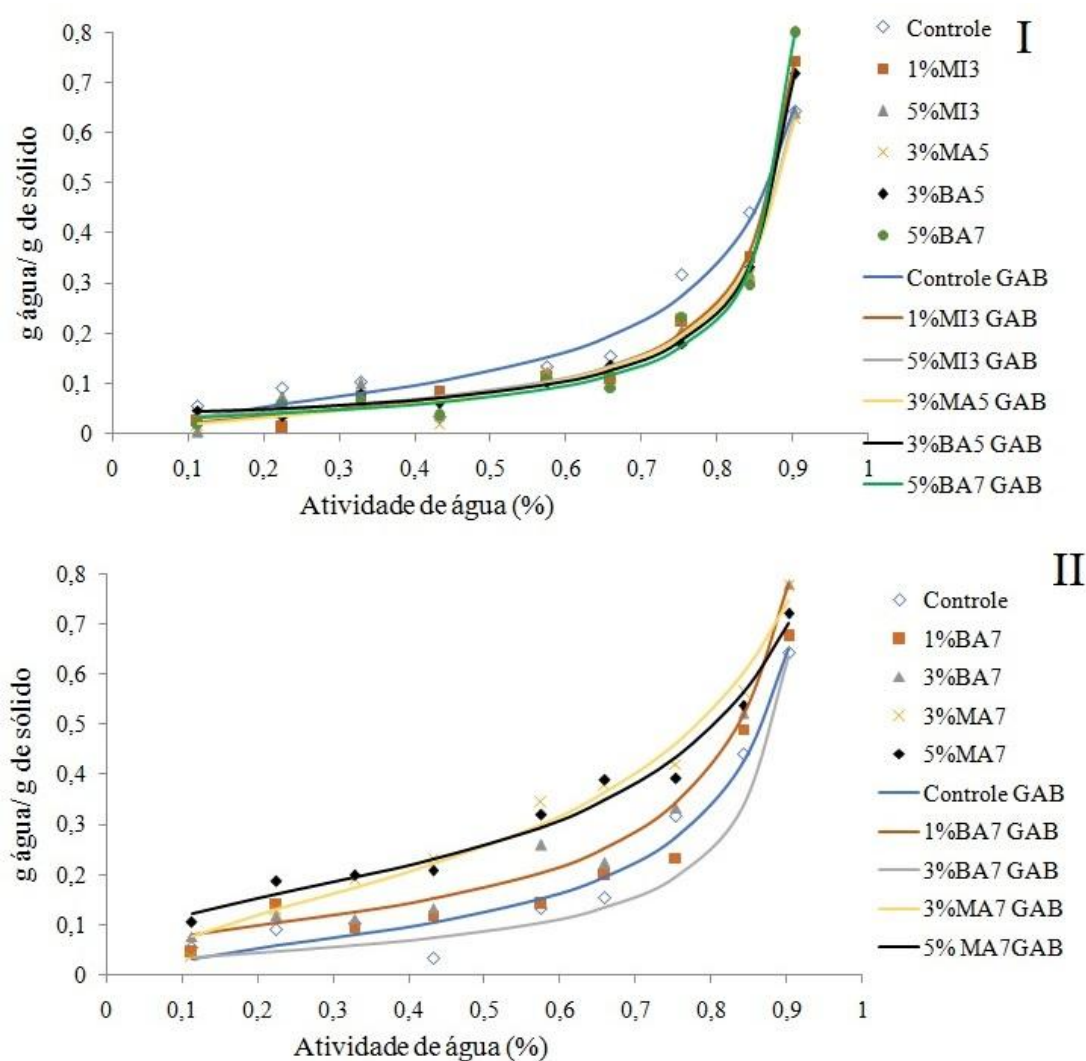
### 3.3.4. Isoterma de sorção

A atividade de água do alimento esta relacionada com a vida de prateleira, portanto conhecer o comportamento das embalagens em diferentes umidades relativas (11 a 90%) determina qual embalagem é mais apropriada para proteger os produtos.

As isotermas de sorção dos filmes controle e adicionados de NCA estão apresentadas na Figura 5. As curvas da isoterma mostram o conteúdo de água em equilíbrio (g de água absorvida / g de sólidos secos) em função da atividade de água. Todos os filmes estudados apresentaram isoterma do tipo II onde ocorreu um lento aumento no teor de umidade de equilíbrio na faixa de atividade de água ( $a_w$ ) 0,10 a 0,50, seguido de um aumento mais pronunciado em  $a_w > 0,60$ . Esse comportamento se assemelha ao comportamento de alimentos ricos em açúcares (MOSQUERA; MORAGA; MARTÍNEZ-NAVARRETE, 2012). A adição de NCA teve um efeito mais pronunciado na  $a_w > 0,60$ , quando houve redução ou aumento da umidade de equilíbrio em relação ao filme controle. Teodoro et al. (2015) também observaram este comportamento quando analisaram filmes de mandioca adicionados de nanopartículas de mandioca.

O modelo GAB forneceu um bom ajuste aos dados de umidade de equilíbrio para todas as amostras estudadas, com  $R^2 > 0,98$  (Tabela 5). A umidade na monocamada ( $m_o$ ) indica a quantidade de água fortemente adsorvida em locais específicos na superfície dos materiais (MOSQUERA; MORAGA; MARTÍNEZ-NAVARRETE, 2012). A adição de NCA provocou redução da umidade na  $m_o$ , indicando que as nanopartículas tornaram as OH livres dos filmes indisponíveis. As constantes  $k$  e  $C$  indicam o calor de sorção do vapor de água nas multicamadas e o calor de sorção da monocamada, respectivamente (OLIVATO 2010; BRANDELERO, 2010). De modo geral, os filmes adicionados de NCA, com exceção dos NCA de BA7 e MA7, apresentaram aumento nos valores de  $k$  em relação ao filme controle, indicando que houve redução na interação entre as multicamadas, pois a maior quantidade de nanopartículas favoreceu a ligação entre as moléculas de água e a matriz absorvente. A redução dos valores de  $k$  nos filmes adicionados de NCA de BA7 e MA7 indicou que estes foram mais suscetíveis à absorção de água. Em função da grande variabilidade da

constante  $C$  mostrada para os diferentes filmes, é possível supor que os NCA não interferiram na monocamada. Os filmes adicionados de NCA de 1% e 3% de BA7 exibiram comportamento próximo ao filme controle e os filmes adicionados de 3% e 5% de NCA de MA7 foram mais suscetíveis às moléculas de água, enquanto os demais NCA impediram que as OH se ligassem com a água na superfície dos filmes como também observado na PVA (Tabela 2).



**Figura 5** – Isothermas de adsorção dos filmes controle e adicionados de NCA (grupo I e II).

**Tabela 5** – Parâmetros do modelo de GAB ajustados às isotermas dos filmes controle e adicionados de NCA (Grupo I e II)

Filmes	Parâmetros do Modelo de GAB*			R <sup>2</sup>
	C	K	m <sub>o</sub>	
Controle	5,00	0,98	0,076	0,98
1%MI3	5,97	1,04	0,046	0,99
5%MI3	14,51	1,02	0,044	0,99
3%MA5	4,42	1,03	0,047	0,99
3%BA5	460,69	1,04	0,039	0,99
5%BA7	23,34	1,06	0,036	0,99
1%BA7	43,21	0,99	0,070	0,99
3%BA7	38,16	0,97	0,090	0,99
3%MA7	6,06	0,85	0,180	0,99
5%MA7	23,19	0,86	0,154	0,99

\* $M = \frac{m_o * C * k * a_w}{(1 - k * a_w) * ((1 - k * a_w) + (C * k * a_w))}$  Onde: M= umidade de equilíbrio em relação a atividade de água (a<sub>w</sub>); m<sub>o</sub>= valores da monocamada (g de água / g de sólidos); k e C são constantes

#### 4. CONCLUSÃO

A adição de NCA nos filmes provocou redução da umidade e aumento da cristalinidade e solubilidade, independente do tipo e da concentração de NCA, com exceção dos NCA de MI3 que não interferiram na solubilidade do filme. A adição de NCA de BA5, BA7, MA3, MA5, MI3 e MI5 causaram redução da PVA, enquanto a maior aglomeração das partículas dos NCA de MA7 e MI7 causou aumento na PVA dos filmes em função das ligações de hidrogênio entre si. A morfologia das nanopartículas não influenciou as propriedades mecânicas dos filmes. A ACP permitiu agrupar as amostras de acordo com as propriedades mecânicas dos filmes, os NCA de 3%BA5, 5%BA7, 3%MA5, 1%MI3 e 5%MI3 adicionados aos filmes se destacaram dos demais por melhorar as propriedades de barreira dos biofilmes e aumentar a resistência à tração e o módulo de Young e reduzir a elongação dos mesmos. Os NCA de milho obtidos



após 3 dias de hidrólise na concentração de 1% foram os mais adequados para serem aplicados em filmes à base de amido por reduzir os custos do processo.

## 5. REFERÊNCIAS

ANGELLIER, H.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DOLE, P.; DUFRESNE, A. Thermoplastic starch–waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 531–539, 2006.

ANGELLIER-COUSSY, H.; PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S. N.; DUFRESNE, A.; BERTOFT, E.; PEREZ, S. The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1558–1566, 2009.

ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting – D882-12. (2012) Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 2012.

ASTM. Standard test method for water vapor transmission of material – E96-95.(1985) Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 1995.

BARNDELERO, R. P. H. **Filmes biodegradáveis de amido de poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) adicionados de surfactantes e óleo de soja**. 155f. (Tese de Doutorado). Doutorado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CONDÉS, M. C.; AÑÓN, M. C.; MAURI, A. N.; DUFRESNE, A. Amaranth proteinfilms reinforced with maize starch nanocrystals. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 146–157, 2015.

DAI, L.; QIU, C.; XIONG, L.; SUN, Q. J. Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 174, p. 82–88, 2015.

DE AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, p. 1240–1253, 2009.

GARCIA, N. L.; FAMA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; GOYANES, S. A comparison between the physico-chemical properties of tuber and cereal starches. **Food Research International**, v. 42, p. 976–982, 2009.

GARCÍA, N. L.; RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; GOYANES, S. Physico mechanical properties of biodegradable starch nanocomposites. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 294, p. 169–177, 2009.

GARCÍA, N. L.; RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREND, M.; GOYANESA, S. Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 203–210, 2011.

HULLEMAN, S. H. D.; KALISVAART, M. G.; JANSSEN, F. H. P.; FEIL, H.; Vliegenthart, J. F. G. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticised, compression moulded potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 351–360, 1999.

JIANG, S.; LIU, C.; HAN, Z.; XIONG, L.; SUN, Q. Evaluation of rheological behavior of starch nanocrystals by acid hydrolysis and starch nanoparticles by self-assembly: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 914–922, 2016.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2058–2076, 2012.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 146–158, 2007.

LABET, M.; THIELEMANS, W.; DUFRESNE, A. Polymer grafting onto starch nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2916–2927, 2007.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Evidence of micro- and nanoscaled particles during starch nanocrystals preparation and their isolation. **Biomacromolecules**, n. 12, p. 3039–3046, 2011.

LI, X.; QIU, C.; JI, N.; SUN, C.; XIONG, L.; SUN, Q. Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 155–162, 2015.

MA, X.; JIAN, R.; CHANG, P. R.; YU, J. Fabrication and characterization of citric acid-modified starch nanoparticles/plasticized-starch composites. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 3314–3320, 2008.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; DA SILVA, J. B.; CRUZ, L. S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, E. J. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1275–1282, 2014.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, n. 50, p. 379–386, 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Review: Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010.

MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, n. 2, 431–441, 1963.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. Sustainable bio-composites from renewable resources: Opportunities and challenges in the green materials world. **Journal of Polymers and Environmental**, v. 10, p. 19–26, 2002.

MOSQUERA, L. H.; MORAGA, G.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum. **Food Research International**, v. 47, p. 201–206, 2012.

MUKURUMBIRA, A. R.; MELLEEN, J. J.; AMONSOU, E. O. Effects of amadumbe starch nanocrystals on the physicochemical properties of starch biocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 142–148, 2017.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Stärke**, v. 35, n. 12, p. 407–410, 1983.

OLIVATO, B. J. **Compatibilizantes na extrusão reativa de blendas amido/poli (butileno adipato co-tereftalato) para a produção de filmes biodegradáveis**. 97f. (Dissertação de Mestrado). Doutorado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

OLIVATO, J. B.; GROSSMANN, M. V. E.; BILCK, A. P.; YAMASHITA, F. Effect of organic acids as additives on the performance of thermoplastic starch/polyester blown films. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 159–164, 2012.

PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 439–449, 2013.

PUTAUX, J-L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; MOMAUR, T.; DUFRESNE, A. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1198–1202, 2003.

SHI, A.-M.; WANG, L.-J.; LI, D.; ADHIKARI, B. Characterization of starch films containing starch nanoparticles: part 1: Physical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 593–601, 2013.

SILVA, J. B. A.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Cassava starch-based films plasticized with sucrose and inverted sugar and reinforced with cellulose nanocrystals. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 6, p. 14–19, 2012.

SILVA, K. S.; MAURO, M. A.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. M. R. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 179–188, 2016.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A. Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 53–61, 2014.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, v. 2, p. 84–95, 2007.

TEODORO, A. P.; MALI, S.; ROMERO, N.; CARVALHO, M. G. Cassava starch films containing acetylated starch nanoparticles as reinforcement: Physical and mechanical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 9–26.

VIGUIÉ, J.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DUFRESNE, A. Processing and characterization of waxy maize starch films plasticized by sorbitol and reinforced with starch nanocrystals. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 1206–1216, 2007.

WEI, B.; HU, X.; LI, H.; WU, C. XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Effect of pHs on dispersity of maize starch nanocrystals in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 369–373, 2014.

## CONCLUSÃO GERAL

Os amidos isolados apresentaram pureza suficiente para serem usados neste trabalho com teores de amilose, padrão cristalino, distribuição do comprimento de cadeias laterais da amilopectina, propriedades de pasta e térmicas característicos para cada fonte botânica.

A estrutura e o empacotamento cristalino do amido influenciam a taxa de hidrólise, enquanto o tempo de hidrólise influenciou principalmente o tamanho de partícula, a cristalinidade e as propriedades térmicas das amilodextrinas. O amido de mandioca foi o mais suscetível a hidrólise ácida, em função dos defeitos da estrutura cristalina deste amido. As amilodextrinas de mandioca e milho (padrão tipo A) exibiram estruturas termicamente mais estáveis que as amilodextrinas de batata (padrão tipo B). As micro- e a nano-estruturas observadas nas amilodextrinas estavam relacionadas com as partículas cristalinas e com a organização das duplas hélices, respectivamente.

Os NCA com padrão cristalino tipo A exibiram formatos de plaquetas, enquanto NCA tipo B eram arredondados. Esses formatos se relacionaram com os arranjos ortorrômbico e hexagonal, respectivamente dos alomorfos tipos A e B. Independente do padrão cristalino, os NCA eram formados por cadeias com GP 10-15. Sua organização molecular sugere que os poucos pontos de ramificação presente nos NCA com padrão B estão localizados principalmente nas extremidades não-redutoras da estrutura, enquanto nos NCA tipo A eles estão em maior quantidade dispersos na estrutura cristalina e próximos às extremidades redutoras. A organização das duplas hélices e as curtas distâncias entre os pontos de ramificação que se posicionam lado a lado de forma ordenada na lamela cristalina influenciou o formato de plaqueta dos NCA tipo A, enquanto a menor quantidade pontos de ramificação na lamela cristalina e as cadeias mais longas que intercalam em mais de um plano cristalino influenciou o empacotamento mais aberto das duplas hélices e o formato arredondado dos NCA tipo B.

O estudo mostrou que, independente do tipo cristalino e morfologia, o uso de NCA como reforço em biofilmes à base de amido de mandioca é uma prática viável e promissora. A análise de componentes principais permitiu concluir que amostras de

NCA de 3%BA5, 5%BA7, 3%MA5, 1%MI3 e 5%MI3 adicionadas aos filmes se destacaram das demais por melhorar as propriedades de barreira e mecânicas dos mesmos. Assim, NCA de milho obtidos após 3 dias de hidrólise na concentração de 1% foram os mais adequados para serem aplicados em filmes à base de amido por reduzir os custos do processo.

Visando a escala industrial, amidos com padrão cristalino tipo A, em especial, o amido de mandioca, é mais adequado para a produção de nanocristais, pois 3 dias de hidrólise foi suficiente para obtenção de cristais mais estáveis e em escala nanométrica.