



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Thaís de Souza Rocha

***Estudo das características estruturais
de amidos: efeito do 'annealing', da
hidrólise ácida e da hidrólise
enzimática***

São José do Rio Preto-SP

2010

Thaís de Souza Rocha

***Estudo das características estruturais
de amidos: efeito do ‘annealing’, da
hidrólise ácida e da hidrólise
enzimática***

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

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

São José do Rio Preto – SP

2010

Rocha, Thaís de Souza.

Estudo das características estruturais de amidos: efeito do ‘annealing’, da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática / Thaís de Souza Rocha. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010. 178 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Célia Maria Landi Franco

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Amido – Annealing. 3. Amido – Hidrólise ácida. 4. Amido – Hidrólise enzimática. 5. Amido – Estrutura. 6. Amido – Cristalinidade . 7. Amido de mandioca-salsa. I. Franco, Célia Maria Landi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.27

Thaís de Souza Rocha

***Estudo das características estruturais de amidos: efeito do
'annealing', da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática***

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a Célia Maria Landi Franco
Universidade Estadual Paulista
São José do Rio Preto, SP

Prof. Dr^a Marney Pascoli Cereda
Universidade Universidade Católica Dom Bosco
Campo Grande, MS

Prof. Dr^a Silene Bruder Silveira Sarmiento
Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Piracicaba, SP

Prof^a Dr^a Eleni Gomes
Universidade Estadual Paulista
São José do Rio Preto, SP

Prof^a Dr^a Mieko Kimura
Universidade Estadual Paulista
São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto, 01 de setembro de 2010.

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste curso de Doutorado não é fruto apenas do meu esforço. O mérito deste trabalho deve ser dividido com muitas pessoas que, de maneira direta ou indireta, participaram da realização dele. Minha família tem uma grande parcela. Minhas irmãs Lígia e Aline, minhas tias Jeni, Alice e Vera, minha sobrinha Olívia, meu pai Nelson e especialmente minha mãe Edith, uma mulher guerreira que sempre lutou por mim, e que a vida toda foi meu porto seguro. Há também minha avó Maria, que se foi muito cedo, mas que acredito estar sempre olhando por mim.

Outra pessoa importante que deve levar grande crédito pela realização deste Doutorado é a minha orientadora e amiga Célia Maria Landi Franco. Além da orientação e do direcionamento da pesquisa, foi ela quem tornou possível o grande sonho de realizar um estágio nos EUA. Além disso, ainda teve iniciativa e determinação para conseguir auxílio financeiro que permitiu a conclusão do curso. Agradeço também à Dra. Jay-lin Jane, que me acolheu em seu laboratório na Iowa State University e permitiu que eu realizasse parte da pesquisa por lá.

Devo muito às amigas queridas Carolina Merheb, Aline, Denise, Raquel Bombarda, Larissa, Flaviana, Jaqueline, Marina, Suélen, Verena, Amanda, Rafaela, Florence, Ellen, Raquel Gutierrez e Carolina Melki, por todo o companheirismo, ajudas, ensinamentos, paciência e consolos, coisas que só grandes amigos podem ter. Em especial, agradeço às alunas de iniciação científica Verena, Suélen, Amanda, Florence e Rafaela pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Outro grupo de amigos muito especiais é aquele que fiz nos EUA. São eles os brasileiros Surema, Maria Inez, Luciano, Neiva, Juliana, Kida, Marcos, Bruno, Edna, Márcio e Rafael, o mexicano Geraldo, o português Pedro, os turcos Evrim e Butch, o grego Aris, os nigerianos Sipho e Manuela, a americana Jayme, a croata Jelena, os indonésios Stephen e Jovin, a tailandesa Kook, os chineses Yongfeng, Sun, Du, Qiang, Hongxing e os sul-coreanos Jongtae e Min. A convivência e o carinho deles fez com que eu me sentisse em casa.

Agradeço aos professores membros da banca examinadora por aceitarem fazer parte deste trabalho. Obrigada aos professores do DETA, e à colaboração dos técnicos de laboratório, em especial à Alana, que se tornou também uma amiga.

À Dra. Maria Cristina Dias Paes da EMBRAPA Milho e Sorgo, e ao Sr. Marcelo Nichi da Corn Products do Brasil, pelo fornecimento das amostras de milho normal e milho ceroso, respectivamente.

Pelo auxílio financeiro concedido pela FAPESP, e pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação, também agradeço. Sem auxílio financeiro este trabalho não seria possível.

A todos, muito obrigada.

*“Sonho que se sonha só é só um sonho
que se sonha só, mas sonho que se
sonha junto é realidade.”
(Raul Seixas)*

RESUMO

Para auxiliar o entendimento da estrutura semicristalina de grânulos de amido, o ‘annealing’ e as hidrólises ácida e enzimática de amidos granulares podem ser empregados. Este trabalho teve o objetivo de utilizar estes tratamentos para obter maiores informações sobre a estrutura granular de amidos de diferentes fontes botânicas, além de compreender o mecanismo de reorganização da estrutura granular provocada pelo ‘annealing’. Amidos de milho normal, milho ceroso, mandioca, mandioquinha-salsa e batata foram isolados e caracterizados quanto a sua composição química, distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina, difração de raios-X, propriedades de pasta e propriedades térmicas. Suspensões de amidos nativos (5% p/v) foram submetidas ao ‘annealing’ à temperatura de 2 a 3 °C menores que as temperaturas de início de gelatinização de cada amido, por 24 horas. Após ‘annealing’, os amidos foram avaliados quanto às suas características morfológicas (microscopia óptica, SEM e microscopia a laser confocal), teores de amilose, distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina, difração de raios-X, massa molar da amilopectina, propriedades térmicas e suscetibilidade às hidrólises enzimática (alfa-amilase e amiloglucosidase) e ácida. Os amidos submetidos à hidrólise enzimática ou ácida (em diferentes tempos) foram também avaliados quanto ao teor de amilose, massa molar da amilopectina, SEM, distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina, difração de raios-X e propriedades térmicas. O amido de mandioquinha-salsa apresentou características estruturais diferentes das apresentadas pelos outros amidos. Como o amido de batata, este amido apresentou polimorfismo tipo B e altas proporções de cadeias laterais muito longas ($DP > 37$) da amilopectina, o que pode ter superestimado o teor de amilose aparente destes amidos. No entanto, o amido de mandioquinha-salsa também apresentou grande quantidade de cadeias curtas ($DP\ 6-12$) da amilopectina. Os amidos de milho normal e milho ceroso apresentaram padrão polimórfico tipo A e o amido de mandioca apresentou padrão tipo C_A . Após ‘annealing’, as propriedades térmicas de todos os amidos foram afetadas (aumento das temperaturas e redução da faixa de temperatura de gelatinização). As entalpias de gelatinização permaneceram inalteradas para os amidos de milho normal e mandioca e aumentaram para os de milho ceroso, mandioquinha-salsa e batata. A cristalinidade relativa destes três últimos amidos também aumentou, sugerindo que estes apresentavam maior propensão à reorganização da estrutura cristalina. Maior suscetibilidade à hidrólise enzimática foi observada para os amidos nativos de milho

normal e milho ceroso, enquanto maior suscetibilidade ao ácido foi observada para o amido de mandioquinha-salsa. O ‘annealing’ tornou os amidos de milho normal, mandioca e mandioquinha-salsa mais suscetíveis à ação das enzimas, principalmente na primeira fase de hidrólise onde as regiões amorfas foram mais atacadas. Para todos os amidos, com exceção do de batata que foi pouco hidrolisado pelas enzimas, a amilose passou a ser mais degradada após o tratamento hidrotérmico, provavelmente devido à maior exposição desta molécula provocada pela reorganização estrutural. Também foi observado aumento na suscetibilidade dos amidos submetidos à hidrólise ácida na primeira fase da hidrólise, o que reforça a possibilidade de maior exposição das moléculas de amilose após ‘annealing’. O tratamento hidrotérmico causou um efeito protetor em relação à degradação da amilopectina pelas enzimas para todos os amidos, com exceção do amido de milho normal provavelmente devido ao aumento de poros na superfície de seus grânulos. Enquanto o padrão de difração de todos os amidos tipo A e B permaneceu inalterado após hidrólise enzimática e ácida, o padrão de difração do amido de mandioca mudou de C_A para A após ação das enzimas, sugerindo ataque preferencial destas aos cristais tipo B presentes naquele amido. Os resultados indicam que o ‘annealing’ causa reorganização da estrutura cristalina aumentando a interação entre as moléculas de amilopectina e expondo as moléculas de amilose à ação de enzimas e do ácido. Desta forma as moléculas de amilopectina foram menos degradadas pelas enzimas, mas continuaram a ser degradadas pelo ácido, provavelmente devido ao menor tamanho das moléculas de ácido em relação às enzimas, o que permite sua penetração com mais facilidade no interior do grânulo. A suscetibilidade dos amidos às enzimas e ao ácido, assim como a influencia do ‘annealing’ nestes tratamentos dependem da fonte botânica dos amidos e de suas características estruturais.

ABSTRACT

To help understanding the semi-crystalline structure of starch granules, the annealing, the enzymatic and acid hydrolysis can be performed. Objectives of this study were to use these treatments to obtain more information about the granular structure of starches from different botanical sources, and help comprehend the starch granular reorganization mechanism provoked by annealing. Normal corn, waxy corn, cassava, Peruvian carrot and potato starches were isolated and characterized regarding their chemical composition, amylopectin branch-chain length distribution, X-ray diffraction, pasting properties and thermal properties. Starches suspensions (5% w/v) were subjected to annealing for 24h at 3 °C below the onset gelatinization temperatures of each starch. After annealing, the starches were evaluated regarding their morphological characteristics (optical microscopy, SEM, laser confocal microscopy), amylose content, amylopectin branch-chain length distribution, X-ray diffraction, amylopectin molar mass, thermal properties and susceptibility to enzymatic hydrolysis (alpha-amylase and amiloglucosidase) and acid hydrolysis. The starches subjected to enzymatic and acid hydrolysis (at different times) were also evaluated regarding their amylose content, amylopectin molar mass, SEM, amylopectin branch-chain length distribution, X-ray diffraction and thermal properties. Peruvian carrot starch had structural characteristics different of that of the other starches. As potato starch, it displayed a B-type X-ray diffraction pattern and high proportion of very long amylopectin branch-chains ($DP \geq 37$), which may have overestimated the apparent amylose content of these starches. However, the Peruvian carrot starch also displayed a high amount of short amylopectin branch-chains (DP 6-12). Normal corn and waxy corn starches displayed an A-type pattern and cassava starch displayed a C_A -type. After annealing, the thermal properties of all starches were affected (increase of gelatinization temperatures and decrease of the gelatinization temperatures interval). The enthalpy change remained unchanged for normal corn and cassava starches and increased for waxy corn, Peruvian carrot and potato starches. The crystallinity percentage also increased for these three starches, suggesting high propensity to crystalline structure reorganization. High susceptibility to enzymatic hydrolysis was observed for normal and waxy corn starches, whereas higher susceptibility to acid hydrolysis was observed for Peruvian carrot starch. The annealing made the normal corn, cassava and Peruvian carrot starches more susceptible to the enzymes action, mainly during the first phase of hydrolysis where the amorphous regions were more degraded. For all starches, except for the potato

starch which was slightly hydrolyzed by the enzymes, the amylose became more degraded after annealing, probably due to a higher exposition of this molecule provoked by the structural reorganization. It was also observed increase on the susceptibility of the starches toward the acid hydrolysis at the first phase of hydrolysis, which also suggests higher exposure of amylose molecules after annealing. The hydrothermal treatment provoked a protective effect in relation to the enzyme degradation of amylopectin molecules of all starches, except to normal corn starch probably due to an increase of the number of pores on the surface of the granules. The A and B-type of X-ray diffraction pattern remained unchanged after enzymatic and acid hydrolysis and it changed from C_A to A-type for cassava starch after the action of enzymes, suggesting a preferential attack to the B-type crystals of this starch. These results indicated that the annealing caused a crystalline structural reorganization increasing the interaction of amylopectin molecules and exposing the amylose molecules to the action of enzymes and acid. Thus the amylopectin molecules were less degraded by the enzymes, but they were still degraded by the acid probably due to the smaller size of the acid molecules, which allows easier penetration inside the granule. The susceptibility to enzymes and acid, as the influence of annealing on these treatments, are dependent to the botanical source of the starches and to their structural characteristics.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	29
Figura 1. Representação esquemática da estrutura do grânulo de amido. Adaptado de (a) Jacobs e Delcour (1998) e (b) Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).....	31
Figura 2. Representação esquemática da organização dos grânulos de amido (JANE, 2009).....	34
Figura 3. Representação esquemática dos efeitos da temperatura de crescimento da planta nas regiões cristalinas e amorfas de amidos de batata; (a) maior temperatura (25 °C) (b) menor temperatura (10 °C). Adaptado de Protserov et al. (2002).....	35
 Capítulo 2	 51
Figura 1. Microscopia eletrônico de varredura dos grânulos dos amidos: (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata ...	63
Figura 2. Perfis de distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos das diferentes fontes botânicas, através de eletroforese capilar de fluorescência. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.....	66
Figura 3. Perfil de eluição dos amidos nativos: (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.....	68
Figura 4. Difractogramas de raios-X dos amidos das diferentes fontes botânicas. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata	70
Figura 5. Perfil viscoamilográfico dos amidos das diferentes fontes botânicas. (○) milho normal; (▲) milho ceroso; (□) mandioca, (●) mandioquinha-salsa; (×) batata.....	72
Figura 6. Perfil endotérmico observado por DSC dos amidos das diferentes fontes botânicas. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata	74

Capítulo 3 80

- Figure 1.** Branch-chain length distribution of amylopectins of (a) Peruvian carrot, (b) cassava, and (c) potato native starches.....87
- Figure 2.** X-ray patterns of starches before and after annealing: (a) Peruvian carrot, (b) cassava, and (c) potato 88
- Figure 3.** Micrographs of starches: (1) Scanning electron micrographs, (2) confocal laser scattering micrographs (left) and overlaid optical and confocal laser scattering micrographs (right). Native starches: Peruvian carrot (a), cassava (b), and potato (c). Annealed starches: Peruvian carrot (d), cassava (e) and, potato (f) 91
- Figure 4.** Enzymatic hydrolysis of starches before (●) and after (□) annealing. Peruvian carrot (a), cassava (b), and potato (c) 94

Capítulo 4 103

- Figure 1.** Branch-chain length distribution of amylopectins: (a) normal corn starch , (b) waxy corn starch.....109
- Figure 2.** X-ray diffraction patterns of starches before and after annealing: (a) normal corn starch, (b) waxy corn starch.....111
- Figure 3.** Scanning electron micrographs of starches: (a) native normal corn starch, (b) native waxy corn starch, (c) annealed normal corn starch, (d) annealed waxy corn starch 113
- Figure 4.** Enzymatic hydrolysis of starches before (●) and after (□) annealing: (a) normal corn starch, (b) waxy corn starch 114

Capítulo 5 121

- Figura 1.** Perfil de hidrólise enzimática dos amidos antes (●) e após (□) ‘annealing’. (a) mandioquinha-salsa; (b) mandioca; (c) batata.....128
- Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos dos amidos submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’. Antes do ‘annealing’: mandioquinha-salsa (a) 0h, (b) 96h; mandioca (e) 0h, (f) 96h; batata (i) 0h,

	(j) 96h; Após ‘annealing’: mandioquinha-salsa (c) 0h, (d) 96h; mandioca (g) 0h, (h) 96h; batata (k) 0h, (l) 96h.....	129
Figura 3.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise enzimática. Antes do ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h. Após ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h	131
Figura 4.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise enzimática. Antes do ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h. Após ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h	133
Figura 5.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de batata submetidos à hidrólise enzimática. Antes do ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h. Após ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h	135
Figura 6.	Difractogramas de raios-X dos amidos submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’: (a) mandioquinha-salsa; (b) mandioca; (c) batata.....	138

Capítulo 6 145

Figura 1.	Perfil de hidrólise ácida dos amidos, antes (●) e após (□) ‘annealing’. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioquinha-salsa; (d) mandioca; (e) batata	151
Figura 2.	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido milho normal. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias	153
Figura 3.	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido milho ceroso. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias	154
Figura 4.	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias	155
Figura 5.	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido mandioca.	

	Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias	155
Figura 6.	Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido batata. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias.....	156
Figura 7.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de milho normal submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias	158
Figura 8.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de milho ceroso submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias	160
Figura 9.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias	161
Figura 10.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias	164
Figura 11.	Distribuição dos comprimentos de cadeias desramificadas da amilopectina dos amidos de batata submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias	165
Figura 12.	Cromatogramas de HPAEC-PAD dos amidos submetidos à hidrólise ácida obtidos após 9 dias de hidrólise, sem desramificar (gráficos superiores) e desramificados por isoamilase (gráficos inferiores)	166
Figura 13.	Cromatogramas de HPAEC-PAD dos amidos submetidos à hidrólise ácida obtidos após 3, 9 e 18 dias de hidrólise, sem desramificar.....	168
Figura 14.	Difractogramas de raios-X dos amidos submetidos á hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioquinha-salsa; (d) mandioca; (e) batata	171

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 51

Tabela 1.	Teor de lipídeos e de fósforo dos amidos das diferentes fontes botânicas (% em relação à matéria seca).....	61
Tabela 2.	Tamanho dos grânulos dos amidos antes e após ‘annealing’	63
Tabela 3.	Afinidade por iodo, teor de amilose aparente e absoluto dos amidos das diferentes fontes botânicas	64
Tabela 4.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos das diferentes fontes botânicas, através de eletroforese capilar de fluorescência	66
Tabela 5.	Propriedades de pasta dos amidos das diferentes fontes botânicas	71
Tabela 6.	Propriedades térmicas dos amidos das diferentes fontes botânicas.....	73
Tabela 7.	Propriedades térmicas dos amidos retrogradados	75

Capítulo 3 80

Table 1.	Branch-chain length distribution of amylopectin of starches in mass-basis, measured by fluophore-assisted capillary electrophoresis	87
Table 2.	Percentage of crystallinity and amylose content of starches before and after annealing.....	90
Table 3.	Thermal properties of starches, before and after annealing	93
Table 4.	Amylose content and average amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues, before and after annealing.....	96

Capítulo 4 103

Table 1.	Apparent amylose content, percentage of crystallinity and average amylopectin molar mass (M_w) and gyration radius (R_z) of starches.....	109
Table 2.	Branch-chain length distribution of amylopectin of starches in mass-basis, measured by fluophore-assisted capillary electrophoresis	110

Table 3.	Thermal properties of starches, before and after annealing	112
Table 4.	Amylose content and amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues, before and after annealing.....	115

Capítulo 5 121

Tabela 1.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’	132
Tabela 2.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’	134
Tabela 3.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de batata submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’	136
Tabela 4.	Porcentagem de cristalinidade dos amidos submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’	137
Tabela 5.	Propriedades térmicas dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’	139
Tabela 6.	Propriedades térmicas dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’	140
Tabela 7.	Propriedades térmicas dos amidos de batata submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	141

Capítulo 6 145

Tabela 1.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de milho normal antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida	157
Tabela 2.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de milho ceroso antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida	159

Tabela 3.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de mandioquinha-salsa, antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida.....	162
Tabela 4.	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de mandioca antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida.....	163
Tabela 5.	Distribuição dos comprimentos de cadeias desramificadas das amilopectinas dos amidos de batata antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida.....	163
Tabela 6.	Razão (R) entre as áreas dos cromatogramas do pico de cadeias uni-ramificadas (pico 2) para o pico de cadeias lineares (pico 1) dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	167
Tabela 7.	Porcentagem de cristalinidade dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	170
Tabela 8.	Teor de amilose aparente dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	172
Tabela 9.	Propriedades térmicas dos amidos de milho normal submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	174
Tabela 10.	Propriedades térmicas dos amidos de milho ceroso submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	175
Tabela 11.	Propriedades térmicas dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	176
Tabela 12.	Propriedades térmicas dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	177
Tabela 13.	Propriedades térmicas dos amidos de batata submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’	177

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	16
INTRODUÇÃO GERAL	27
<i>CAPÍTULO 1: Conhecimentos atuais sobre a estrutura granular de amidos gerados a partir do ‘annealing’, da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática – Revisão de literatura</i>	29
RESUMO	30
1.1 CONHECIMENTOS GERAIS SOBRE A ESTRUTURA GRANULAR DOS AMIDOS	30
1.2 ‘ANNEALING’	36
1.3 HIDRÓLISE ÁCIDA DO AMIDO GRANULAR	38
1.3.1 Influência do ‘annealing’ na hidrólise ácida	40
1.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO GRANULAR	42
1.4.1 Influência do ‘annealing’ na hidrólise enzimática	44
1.5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
<i>CAPÍTULO 2: Caracterização físico-química e estrutural de amidos de diferentes fontes botânicas</i>	51
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	52

2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1	Material	54
2.2	Métodos	54
2.2.1	Isolamento dos amidos.....	54
2.2.2	Composição química.....	55
2.2.3	Distribuição dos tamanhos dos grânulos.....	55
2.2.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	56
2.2.5	Teor de amilose.....	56
2.2.5.1	<i>Isolamento das amilopectinas</i>	56
2.2.5.2	<i>Determinação do teor de amilose aparente e absoluto</i>	56
2.2.6	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina através de eletroforese capilar de fluorescência	57
2.2.6.1	<i>Isolamento das amilopectinas</i>	57
2.2.6.2	<i>Desramificação das amostras com isoamilase</i>	57
2.2.6.3	<i>Preparo das amostras desramificadas para eletroforese capilar de fluorescência</i>	57
2.2.6.4	<i>Eletroforese capilar de fluorescência</i>	58
2.2.7	Distribuição do tamanho molecular dos amidos através de cromatografia de permeação em gel (GPC)	58
2.2.8	Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade	58
2.2.9	Propriedades de pasta.....	59
2.2.10	Propriedades térmicas	59
2.2.11	Análise estatística	60
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1	Isolamento dos amidos	60

3.2	Composição química	61
3.3	Morfologia e tamanho dos grânulos dos amidos.....	62
3.4	Teor de amilose	64
3.5	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina	65
3.6	Distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido por cromatografia de permeação em gel (GPC)	67
3.7	Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade.....	68
3.8	Propriedades de pasta.....	70
3.9	Propriedades térmicas	72
4.	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

CAPÍTULO 3: Structural characterization of Peruvian carrot starch and effect of annealing on its semi-crystalline structure..... 80

	ABSTRACT	81
1.	INTRODUCTION	82
2.	MATERIAL AND METHODS.....	83
2.1	Material	83
2.2	Methods	83
2.2.1	Isolation of starches	83
2.2.2	Annealing	83
2.2.3	Amylopectin branch-chain length distribution.....	84
2.2.4	Wide-angle X-ray diffraction	84
2.2.5	Average amylopectin molar mass and gyration radius	84

2.2.6	Amylose content and amylose leached	85
2.2.7	Scanning electron microscopy	85
2.2.8	Confocal scanning laser microscopy	85
2.2.9	Thermal properties	85
2.2.10	Enzymatic hydrolysis	86
2.2.11	Statistical analysis	86
3.	RESULTS AND DISCUSSION	86
3.1	Amylopectin branch-chain length distribution.....	86
3.2	X-ray pattern and crystallinity	88
3.3	Average amylopectin molar mass, gyration radius and molecular density.....	89
3.4	Amylose content	89
3.5	Morphology and internal structure.....	90
3.6	Thermal properties	92
3.7	Enzymatic hydrolysis	93
3.8	Amylose content of the enzymatic hydrolysis residues	95
3.9	Average amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues.....	96
4.	CONCLUSION	98
	REFERENCES	98
	<i>CAPÍTULO 4: Effect of annealing on the semi-crystalline structure of normal and waxy corn starches.....</i>	<i>103</i>
	ABSTRACT	104
1.	INTRODUCTION	105

2.	MATERIAL AND METHODS	105
2.1	Material	105
2.2	Methods	106
2.2.1	Isolation of starches	106
2.2.2	Annealing	106
2.2.3	Amylose content and amylose leached	106
2.2.4	Amylopectin branch-chain length distribution	106
2.2.5	Wide-angle X-ray diffraction	107
2.2.6	Average amylopectin molar mass and gyration radius	107
2.2.7	Thermal properties	107
2.2.8	Scanning electron microscopy	108
2.2.9	Enzymatic hydrolysis	108
2.2.10	Statistical analysis	108
3.	RESULTS AND DISCUSSION	108
3.1	Amylose content	108
3.2	Amylopectin branch-chain length distribution	109
3.3	X-ray pattern and crystallinity	110
3.4	Average amylopectin molar mass, gyration radius and molecular density	111
3.5	Thermal properties	111
3.6	Morphology	113
3.7	Enzymatic hydrolysis	114
3.8	Apparent amylose content of the enzymatic hydrolysis residues	115
3.9	Average amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues	116

LITERATURE CITED	117
------------------------	-----

CAPÍTULO 5: Efeito do ‘annealing’ sobre a suscetibilidade

enzimática de amidos de raízes e tubérculos 121

RESUMO	122
--------------	-----

1. INTRODUÇÃO	122
---------------------	-----

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	123
----------------------------	-----

2.1 Material	123
--------------------	-----

2.2 Métodos	124
-------------------	-----

2.2.1 Tratamento hidrotérmico ‘annealing’	124
---	-----

2.2.2 Hidrólise enzimática	124
----------------------------------	-----

2.2.2.1 <i>Atividade da enzima α-amilase</i>	124
--	-----

2.2.2.2 <i>Atividade da enzima amiloglucosidase</i>	124
---	-----

2.2.2.3 <i>Hidrólise enzimática com α-amilase e amiloglucosidase</i>	125
--	-----

2.2.3 Morfologia dos grânulos de amido	125
--	-----

2.2.4 Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina através de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência	125
---	-----

2.2.4.1 <i>Desramificação dos amidos</i>	125
--	-----

2.2.4.2 <i>Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)</i>	126
---	-----

2.2.5 Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade	126
---	-----

2.2.6 Propriedades térmicas	127
-----------------------------------	-----

2.2.7 Análise estatística	127
---------------------------------	-----

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
---------------------------------	-----

3.1 Cinética de hidrólise enzimática	127
--	-----

3.2	Morfologia dos grânulos de amido	128
3.3	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina	130
3.4	Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade	136
3.5	Propriedades térmicas	138
4.	CONCLUSÃO	141
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
	<i>CAPÍTULO 6: Estudo da suscetibilidade ácida de diferentes amidos submetidos ao ‘annealing’</i>	145
	RESUMO	146
1.	INTRODUÇÃO	147
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	148
2.1	Material	148
2.2	Métodos	148
2.2.1	‘Annealing’ dos amidos	148
2.2.2	Hidrólise ácida.....	148
2.2.3	Morfologia dos grânulos de amidos nativos e tratados por ácido	149
2.2.4	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina através de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência	149
2.2.5	Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade.....	149
2.2.6	Teor de amilose aparente	150
2.2.7	Propriedades térmicas	150
2.2.8	Análise estatística	150
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	151

3.1	Cinética de hidrólise ácida	151
3.2	Morfologia dos grânulos de amido	153
3.3	Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina	156
3.4	Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade	169
3.5	Teor de amilose aparente	171
3.6	Propriedades térmicas	173
4.	CONCLUSÃO	177
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
	CONCLUSÃO GERAL	181

INTRODUÇÃO GERAL

Os amidos são compostos principalmente de duas macromoléculas, a amilose e a amilopectina. Elas estão arrançadas no interior dos grânulos formando uma estrutura semicristalina constituída por camadas contendo lamelas amorfas e cristalinas alternadas. A principal responsável pela cristalinidade dos grânulos de amido é a amilopectina, que, ao contrário da amilose, possui estrutura altamente ramificada. As cadeias ramificadas da amilopectina formam duplas hélices fortemente empacotadas constituindo as lamelas cristalinas, enquanto que os pontos de ramificação estão localizados nas lamelas amorfas. Assim, sugere-se que a amilopectina estaria localizada em regiões cristalinas e semicristalinas, e nesta última, a sua cristalinidade seria reduzida principalmente devido ao maior envolvimento com a amilose.

A localização da amilose e a maneira como participa da cristalinidade dos grânulos de amido ainda não estão bem esclarecidas. Enquanto alguns estudos têm mostrado que a amilose estaria localizada dispersa entre as moléculas de amilopectina e presente, principalmente, na periferia dos grânulos, outros sugerem que este polímero seria sintetizado em feixes separados da amilopectina e não estariam acessíveis às enzimas ramificantes durante a biosíntese do grânulo, justificando sua natureza linear.

O tratamento hidrotérmico ‘annealing’ e as hidrólises ácida e enzimática dos amidos podem ser utilizados para promover um maior entendimento de como estas duas macromoléculas estão distribuídas e como participam da cristalinidade dos grânulos.

O ‘annealing’ é o processo no qual uma suspensão de amido é exposta a uma temperatura superior a de transição vítrea e inferior à temperatura de gelatinização por um determinado período de tempo. Uma discreta reorganização molecular dos grânulos ocorre, com formação de uma estrutura mais organizada e de menor energia livre. Esta técnica simples provoca mudanças marcantes nas propriedades físico-químicas do amido sem destruir sua estrutura podendo fornecer informações úteis para o entendimento da cristalização da amilopectina e da estrutura granular.

A hidrólise ácida provoca a quebra ao acaso das ligações glicosídicas dos polímeros de amilose e amilopectina reduzindo o seu peso molecular. Durante a hidrólise ácida, as regiões amorfas são mais facilmente atacadas do que as regiões cristalinas. O denso empacotamento das duplas hélices na região cristalina dificulta a penetração dos íons de hidrogênio. Desta forma, a ação do ácido sobre os grânulos ocorre em duas etapas, sendo a primeira atribuída à

alta taxa de hidrólise nas regiões amorfas, e a segunda atribuída a uma baixa taxa de hidrólise do material cristalino.

Já na hidrólise enzimática, ao contrário do tratamento ácido, alguns autores têm sugerido que ambas as regiões amorfas e cristalinas são degradadas simultaneamente pelas amilases, sendo a taxa de hidrólise controlada pela fonte botânica do amido, sistema enzimático utilizado, condições de hidrólise (concentração de enzima, pH, temperatura, etc.), tamanho dos grânulos, tipo de cristalinidade polimórfica, entre outros fatores.

A maioria dos estudos sobre estrutura granular de amidos é realizado principalmente com amidos de milho, trigo, mandioca ou batata. Poucos são os estudos de amidos de fontes não convencionais como o de mandioquinha-salsa. Este amido apresenta propriedades funcionais interessantes provavelmente devido à características estruturais peculiares.

Neste trabalho, tanto o ‘annealing’, quanto as hidrólises ácida e enzimática foram utilizados separadamente ou em combinação, visando obter informações para a melhor compreensão da estrutura dos grânulos de amido. Amidos de milho normal, milho ceroso, mandioca e batata, que apresentam razão amilose/amilopectina e características polimórficas diferentes foram utilizados, além do amido de mandioquinha-salsa, que provem de uma fonte não convencional.

Capítulo 1

Conhecimentos atuais sobre a estrutura granular de amidos gerados a partir do ‘annealing’, da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática – Revisão de literatura

Thaís de Souza Rocha; Célia Maria Landi Franco

UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

RESUMO

Por muitos anos as características estruturais de amidos granulares têm sido estudadas, porém a exata localização das macromoléculas amilose e amilopectina que compõem os grânulos de amido e como elas estão empacotadas no interior dos grânulos ainda é motivo de debate. Os amidos granulares são submetidos a diferentes tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos na tentativa de se obter mais informações a respeito de sua estrutura granular. Tratamentos como o ‘annealing’, a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida estão entre os mais utilizados. Esta revisão expõe os recentes conhecimentos sobre a estrutura de amidos e coloca em perspectiva os efeitos dos diferentes tratamentos.

1.1. Conhecimentos gerais sobre a estrutura granular dos amidos

Os grânulos de amido são compostos por dois tipos de α -glucanas: amilose e amilopectina, que diferem no tamanho molecular e grau de ramificação (MIZUKAMI; TAKEDA; HIZUKURI, 1999; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de glicose ligadas em α -1,4 apresentando pequeno número de ramificações (HIZUKURI; TAKEDA; YASUDA, 1981; FRENCH, 1984; BULÉON et al., 1998), enquanto a amilopectina é uma molécula altamente ramificada composta de centenas de pequenas cadeias de unidades de glicose ligadas em α -1,4, com 5 a 6% de ligações α -1,6 nos pontos de ramificação (FRENCH, 1984; LINEBACK, 1984). Estas cadeias da amilopectina são classificadas em cadeias A, B e C. As cadeias A não são ramificadas, as cadeias B apresentam ramificações nas posições C-6 e a cadeia C é a única que apresenta a extremidade redutora (HIZUKURI et al., 1997). A amilose e a amilopectina estão arranjadas no grânulo formando uma estrutura semicristalina.

O grânulo de amido consiste de camadas mais ou menos concêntricas com regiões alternadas de maior e menor índice de refração, densidade e cristalinidade, que presumivelmente representam os anéis de crescimento durante sua biosíntese (BULÉON et al., 1998). A camada densa do anel de crescimento é formada de aproximadamente 16 repetições de lamelas cristalinas e amorfas alternadas (Figura 1a), formando uma camada semicristalina com espessura de 120 a 400 nm (FRENCH, 1984) dependendo da fonte botânica do amido. A amilopectina está presente no grânulo de amido em estrutura semicristalina, enquanto a amilose é amorfa (JANE, 2006).

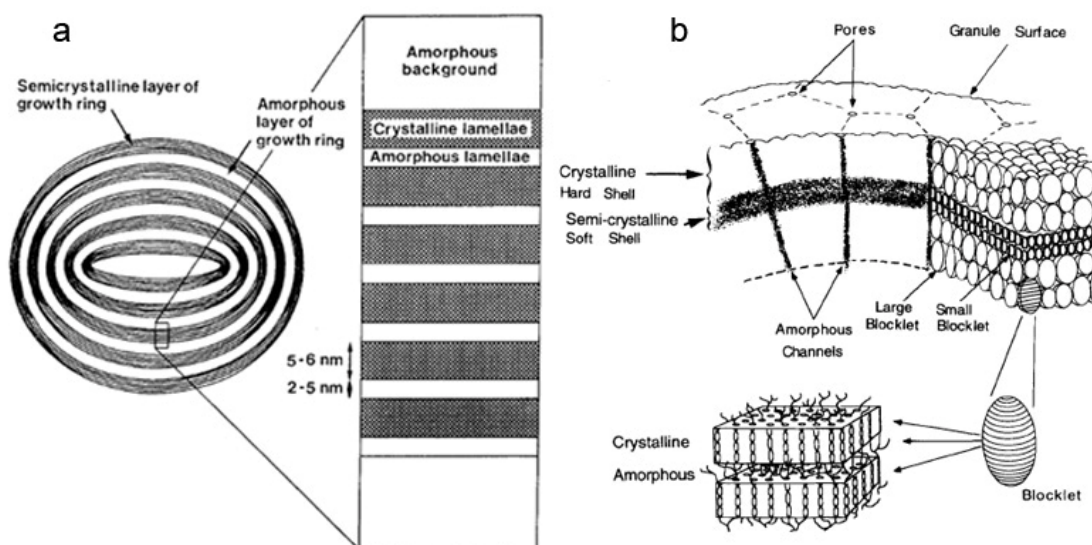


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do grânulo de amido. Adaptado de (a) Jacobs e Delcour (1998) e (b) Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).

Dois modelos principais de estrutura para a amilopectina foram postulados com relação ao modo como as cadeias estão arranjadas para formar uma estrutura altamente ramificada. O modelo fibrilar foi inicialmente proposto por Sterling (1968) e Wetzstein e Sterling (1977), citados por Pérez, Baldwin e Gallant (2009), e ganhou credibilidade a partir da representação de camadas constituída por grupos de ‘clusters’ formados por cadeias curtas (FRENCH, 1984; LINEBACK, 1986). Este modelo foi aceito por décadas mesmo tendo sido provado que as características observadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), que supostamente seriam estruturas fibrilares, eram artefatos (GALLANT; GUILBOT, 1971, apud PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009).

No modelo de estrutura de bloquetes, ‘clusters’ associados de cadeias com DP 15 passam a constituir uma camada cristalina com 60 Å de espessura na direção axial (FRENCH, 1973; ROBIN et al., 1974). Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram que as camadas cristalinas e amorfas da amilopectina estariam organizadas dentro de estruturas maiores mais ou menos esféricas chamadas bloquetes (Figura 1b). Em amidos com um baixo grau de oxidação, observados através de TEM por Gallant e Guilbot (1969), citados por Pérez, Baldwin e Gallant (2009), o marcador PATAg (“periodic acid thiosemicarbazide silver), que penetra e então destaca apenas as regiões amorfas dos grânulos, revelou a presença de regiões elipsoidais rugosas de 20 a 500 nm de diâmetro. Essas estruturas seriam os bloquetes

cristalinos no interior dos grânulos (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997). Através de TEM de alta resolução foi revelado que esses bloquetes seriam compostos de camadas alternadas de lamelas cristalinas e semicristalinas da amilopectina (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

Atualmente, ambos os modelos, fibrilar e de bloquetes, foram fundamentados como verdadeiros (PEREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009). O modelo de bloquetes estaria relacionado a uma maior ordem de organização cristalina e o modelo fibrilar estaria relacionado à organização radial dos polímeros dos amidos. Zhuo et al. (2010), sugeriram, através de imagens de segunda harmônica ('Second Harmonic Generation Imaging' – SHG), que a orientação molecular da amilopectina nos grânulos de amido seria de fato radial e o centro dos grânulos apresentariam um melhor alinhamento das amilopectinas.

Jane (2006) utilizou um método de gelatinização química da superfície dos grânulos de amido para separar a região central da região periférica dos grânulos de amido de batata e milho normal. Esta autora observou, através de cromatografia de permeação em gel, diferentes distribuições de comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina localizadas na superfície e na parte central dos grânulos de amido. O comprimento das cadeias foi menor na periferia do que no interior dos grânulos, concordando com o fato de grânulos menores possuírem cadeias ramificadas mais longas do que grânulos maiores.

As regiões cristalinas consistem de duplas hélices fortemente empacotadas formadas pelas ramificações da amilopectina enquanto os pontos de ramificação estariam localizados na região amorfa (FRENCH, 1973; ROBIN et al., 1974). Os grânulos de amido possuem tipos de cristalinidade diferentes, apresentando os padrões de difração de raios-X do tipo A, B ou C dependendo do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina, descrito principalmente em função das duplas hélices formadas (JANE, 2006). A maioria dos amidos de raízes e tuberosas exibe padrão de difração de raios-X do tipo B com picos que apresentam duas reflexões principais centradas em $5,5^\circ$ e $17,2^\circ$ a 2θ (HOOVER, 2001). O padrão do tipo A, apresentado principalmente em amidos de cereais como milho e trigo, possuem 2 picos entre 16° e 18° e um nas proximidades de 23° a 2θ (GALLANT et al., 1982). Os tipos A e B representam as verdadeiras formas cristalinas do amido. O padrão tipo C observado em amidos como os de ervilha e feijão é tido como uma mistura dos padrões A e B (BULEÓN et al., 1998). O comprimento de cadeia lateral da amilopectina, o número de cadeias por 'cluster' da molécula de amilopectina, a densidade das ramificações nas regiões cristalinas e a proporção de pontos de ramificação na lamela amorfa são considerados os principais

determinantes da cristalinidade polimórfica de amidos granulares (SRICHUWONG et al., 2005a).

Segundo Srichuwong et al. (2005a), a amilopectina de amidos com padrão de difração de raios-X do tipo A possui aproximadamente 12 cadeias por cluster, 4 ou 5 duplas hélices originárias de cadeias lineares com DP 14 e uma ou duas duplas hélices que se originam de cadeias uni-ramificadas que podem estar presentes na parte cristalina principal. No caso de amidos tipo B, as amilopectinas possuem aproximadamente 6 cadeias por 'cluster' e 3 duplas hélices formadas por cadeias lineares com DP 15-16 contidas na lamela cristalina. Duplas hélices obtidas de cadeias uni-ramificadas são raramente encontradas em amidos do padrão tipo B. Imberty et al. (1988) propuseram que as duplas hélices em ambos os tipos A e B são idênticas. No entanto, o empacotamento das mesmas na estrutura polimórfica do tipo A é relativamente compacta com um baixo teor de água, enquanto que o polimorfismo do tipo B possui uma estrutura mais aberta com o centro entre as hélices hidratado (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

A exata localização da amilose e sua atuação na estrutura cristalina dos grânulos de amido ainda são controversas. Três hipóteses foram levantadas. Na primeira hipótese, a amilose estaria localizada tangencialmente à orientação radial da amilopectina e desta forma minimizaria interações helicoidais entre amilose e amilopectina. As outras duas hipóteses estabelecem que a deposição radial da amilose, em feixes ou em cadeias individuais, estaria aleatoriamente interdispersa nos 'clusters' da amilopectina, tanto nas regiões cristalinas como nas semicristalinas. A proposta de que a amilose seria sintetizada em feixes separados da amilopectina se baseia no fato da amilose ser uma molécula linear, e desta forma não estaria acessível às enzimas ramificantes durante a biosíntese dos amidos (BULÉON et al., 1998).

A proposta de cadeias individuais da amilose aparece ser a mais aceitável já que através de reações de ligações cruzadas de amidos de milho normal e de batata com reagentes bifuncionais foi mostrado que não ocorreram ligações cruzadas entre as moléculas de amilose de ambos os amidos, já que não ocorreu aumento na massa molecular deste polímero. Ao contrário, a massa molecular da amilose diminuiu. Já ligações cruzadas entre amilose e amilopectina foram observadas, pois esses polímeros eluíram no volume vazio da coluna através de permeação em gel e o valor de 'Blue Value' aumentou. Esses resultados negam a hipótese das moléculas de amilose serem sintetizadas em feixes isolados da amilopectina e indicam que a amilose estaria sim dispersa entre as moléculas de amilopectina e que os grupos hidroxila dos dois polímeros estariam a uma distância inferior a 7,5 Å (comprimento do

reagente bifuncional) (JANE et al., 1992; KASEMSUWAN; JANE, 1994, JANE, 2006; PEREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009). Os resultados sugerem ainda que as cadeias de amilose de maior massa molecular são preferencialmente ligadas durante reação de ligações cruzadas com as cadeias de amilopectina (JANE, 2006).

Recentes experimentos de gelatinização química de grânulos de amido têm revelado que a amilose, além de localizada dispersa entre as moléculas de amilopectina, estaria localizada mais na periferia do grânulo que em seu interior (JANE, 2006). As moléculas de amilose e amilopectina, que estariam presentes na superfície dos grânulos, estariam mais compactamente associadas e seriam menos suscetíveis a hidrólise por enzimas (JANE, 2006).

Lineback (1984) propôs um modelo esquemático de uma seção transversal do grânulo de amido. Este modelo foi atualizado por Jane (2009) e expõem os atuais conhecimentos da estrutura granular. Neste esquema (Figura 2), as cadeias de amilose estariam localizadas próximas às moléculas de amilopectina e, possivelmente co-cristalizadas com a amilopectina; a amilose estaria mais concentrada na periferia dos grânulos e as amilopectinas na região central teriam maiores comprimentos de cadeias.

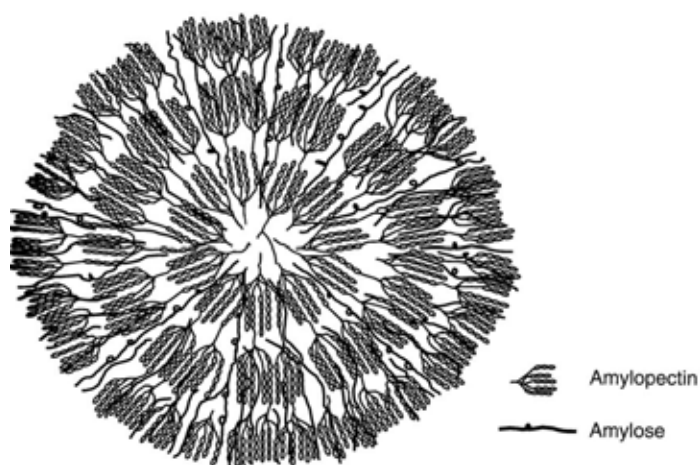


Figura 2. Representação esquemática da organização dos grânulos de amido (JANE, 2009).

A amilose pode romper a ordem estrutural nos cristais da amilopectina (CHEETHAM; TAO, 1997). Durante a biosíntese pode ocorrer, dependendo da temperatura de desenvolvimento da planta, o aparecimento de defeitos na estrutura ordenada dos grânulos de amido. Segundo Protserov et al. (2002), estes defeitos podem ocorrer devido à presença desestabilizante de cadeias de amilose nas regiões amorfas e à presença de subfrações desorganizadas da amilopectina presentes nas regiões cristalinas. Estes autores mostraram que

em amidos de batata, isolados de plantas desenvolvidas em baixas temperaturas, a temperatura de gelatinização era mais baixa do que em amidos obtidos de plantas desenvolvidas a temperaturas mais elevadas, em função da ocorrência de defeitos estruturais associados aos cristais. Assim, uma representação esquemática foi proposta, mostrando que nas lamelas amorfas de amidos de plantas desenvolvidas em temperaturas mais elevadas (Figura 3a), as cadeias longas da amilopectina eram mais rígidas ou vítreas, o empacotamento das duplas hélices era otimizado e as cadeias de amilose mostravam forte interação com a amilopectina, enquanto que em plantas desenvolvidas a baixas temperaturas (Figura 3b), a região amorfa dos amidos apresentava uma estrutura menos ordenada, menos rígida e com uma maior influencia desestabilizante de cadeias de amilose empacotadas com a amilopectina.

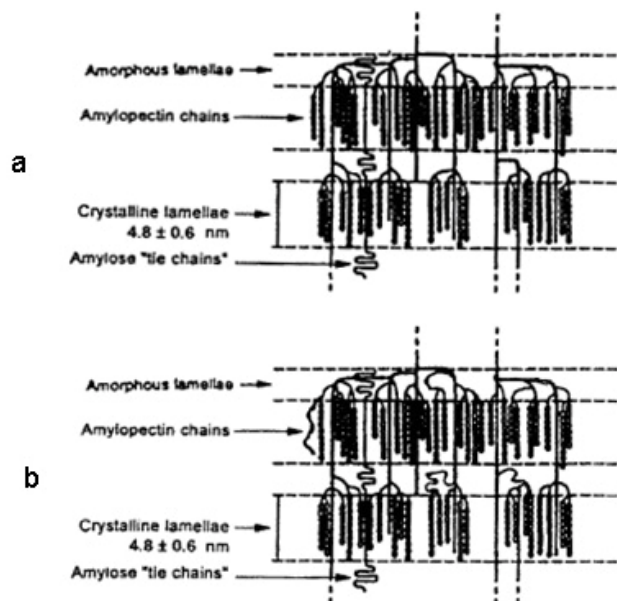


Figura 3. Representação esquemática dos efeitos da temperatura de crescimento da planta nas regiões cristalinas e amorfas de amidos de batata; (a) maior temperatura (25 °C) (b) menor temperatura (10 °C). Adaptado de Protserov et al. (2002).

Genkina et al. (2003) também propuseram que a temperatura de desenvolvimento da planta influencia as características polimórficas dos amidos. Os autores demonstraram que amidos de batata doce cultivada a alta temperatura (33 °C) apresentaram polimorfismo tipo A, enquanto que as cultivadas a baixa temperatura (15 °C) apresentaram polimorfismo tipo C (estrutura menos ordenada). Um aumento na temperatura do solo resultou na transição da estrutura polimórfica do amido tipo C para uma estrutura tipo A.

1.2. ‘Annealing’

Os grânulos de amido, por apresentarem uma estrutura semicristalina estão sujeitos à reorganização estrutural quando submetidos ao ‘annealing’. ‘Annealing’ de amidos é um tratamento hidrotérmico realizado em excesso de água ou em teor de água intermediário (40% p/p) durante certo período de tempo, a temperatura superior à de transição vítrea, mas inferior à de gelatinização do amido (JACOBS; DELCOUR, 1998). Esta definição implica que não ocorre gelatinização durante o tratamento físico. Na prática, os efeitos mais pronunciados do tratamento são obtidos em temperaturas de sub-gelatinização (JACOBS et al., 1998a).

A reorganização da estrutura semicristalina dos grânulos de amido ocorre devido a um aumento na mobilidade das moléculas de amilose e amilopectina em presença de água (BILIADERIS, 2009). A região amorfa dos grânulos é a área mais vulnerável à absorção de água e a hidratação destas regiões induz a movimentações tangencial e radial das cadeias de glicose tanto nos domínios amorfos quanto nos cristalinos (JAYAKODY; HOOVER, 2008; BILIADERIS, 2009). Esta hidratação também provoca um leve inchamento dos grânulos, que é reversível, permitindo que as duplas hélices se alinhem de maneira mais organizada (BILIADERIS, 2009; JAYAKODY; HOOVER, 2008; PERRY; DONALD, 2000). Este tratamento modifica as propriedades físico-químicas sem destruir a estrutura do grânulo de amido. A reorganização provocada pelo ‘annealing’ resulta em uma maior estabilidade das regiões cristalinas associada a um aumento nas temperaturas de gelatinização e estreitamento da faixa de temperatura de gelatinização (GENKINA; WASSERMAN; YURYEV, 2004; KISELEVA et al., 2005).

Apesar desta modificação física já ter sido bastante descrita, ainda não existe um consenso a respeito do mecanismo do processo de ‘annealing’. Vários autores têm discutido o ‘annealing’ de amidos com base nos domínios amorfos e cristalinos, reorganizações moleculares e perfeição dos cristais. De acordo com a literatura, as possíveis explicações para as mudanças que ocorrem nas características físico-químicas dos amidos causadas pelo tratamento hidrotérmico são modificações estruturais tais como: conversão do polimorfismo do tipo B para tipo A (GENKINA et al., 2004); aumento na cristalinidade e perfeição dos cristais devido à otimização do empacotamento das duplas hélices; alongamento das duplas hélices da amilopectina sem aumentar sua quantidade (GENKINA; WASSERMAN; YURYEV, 2004; KISELEVA et al., 2004; VERMEYLEN; GODERIS; DELCOUR, 2006); mudanças nas regiões amorfas diminuindo seus efeitos de desestabilização nos cristais

(KNUTSON, 1990; STUTE, 1992).

Equações que descrevem as mudanças na temperatura de fusão de polímeros semicristalinos sintéticos, as quais são descritas em função de três variáveis: espessura da lamela cristalina, energia superficial livre das faces laterais dos cristais e estrutura polimórfica; podem ser aplicadas ao amido (GENKINA; WASSERMAN; YURYEV, 2004). Desta forma, através de análises das propriedades térmicas utilizando um calorímetro diferencial de varredura de alta sensibilidade (High-Sensitivity DSC), vários pesquisadores relataram que após os amidos serem submetidos ao ‘annealing’ a espessura da lamela cristalina aumentou, o que causou um aumento significativo da temperatura de gelatinização e um leve aumento na entalpia (GENKINA; WASSERMAN; YURYEV, 2004; GENKINA et al., 2004; KISELEVA et al., 2004).

Em amidos de trigo e batata analisados através de SAXS (Small Angle X-ray Scattering), o ‘annealing’ não alterou as repetições das lamelas cristalinas e amorfas dos grânulos e também não provocou mudanças na distância entre estas lamelas, no entanto a densidade eletrônica de contraste nestas duas regiões aumentou (JACOBS et al., 1998b). Este aumento na densidade eletrônica poderia ser decorrência de uma maior densidade nas zonas cristalinas, devido a um empacotamento mais rígido das duplas hélices, ou a uma menor densidade das zonas amorfas, ocorrida pela absorção de água nestas zonas (JACOBS et al., 1998b).

Em estudos realizados por Tester, Debon e Karkalas (1998) através de ressonância magnética nuclear foi constatado que o número total de duplas hélices antes e após o ‘annealing’ de amidos de trigo não foi alterado. Desta forma, os autores concluíram que novas duplas hélices não são formadas durante o tratamento hidrotérmico, mas pode ocorrer uma otimização de seus comprimentos devido a uma movimentação dos finais desordenados das duplas hélices pré-existentes localizadas nos cristais de amido. Os autores sugeriram que a reorganização das moléculas do amido durante o ‘annealing’ ocorre principalmente na lamela cristalina. No entanto, evidências a favor desta suposição foram obtidas apenas para amidos de batata (GENKINA; WASSERMAN; YURYEV, 2004) e cevada (KISELEVA et al., 2004). Mais tarde, Tester, Debon e Sommerville (2000) e Waduge et al. (2006) sugeriram que em amidos com alto teor de amilose, as cadeias de amilose podem ter uma maior proximidade entre elas e entre as cadeias de amilopectina. Conseqüentemente, interações poderiam ocorrer durante o ‘annealing’, o que resultaria na formação de novas duplas hélices. Novas interações entre amilose/amilose, amilose/amilopectina e/ou amilopectina/amilopectina também foram

propostas por Hoover e Vasanthan (1994) e Chung, Liu e Hoover (2009). Regiões cristalinas formadas por duplas hélices de moléculas de amilose apresentam alta temperatura de dissociação (acima de 100 °C), o que as tornam difíceis de serem quantificadas, sugerindo a produção de amido resistente como consequência do ‘annealing’ (TESTER; DEBON; SOMMERVILLE, 2000). Chung, Liu e Hoover (2009) mostraram que a maior interação entre amilose e/ou amilopectina provocada pelo ‘annealing’ resultou em aumento no teor de amido resistente para amidos de ervilha, lentilha e milho normal, mas também aumentou o teor de amido de digestão rápida, devido a uma estrutura mais porosa que permitiu a ação de enzimas no interior dos grânulos desses amidos.

É possível que a elevação das temperaturas de gelatinização do amido provocada pelo ‘annealing’ seja causada, em parte, por mudanças na lamela amorfa. Estruturas menos ordenadas e menos rígidas, e a presença desestabilizante de cadeias de amilose nestas regiões são consideradas defeitos estruturais e tornam o amido mais suscetível à reorganização estrutural durante o tratamento térmico (KISELEVA et al., 2005). Liu et al. (2009), estudando amidos de milho com diferentes razões de amilose/amilopectina, mostraram que as endotermas relacionadas à amilose não apresentaram mudanças significantes após ‘annealing’, indicando que nem o complexo amilose-lipídio ou a agregação de moléculas de amilose foram afetados pelo tratamento hidrotérmico.

1.3. Hidrólise ácida do amido granular

A hidrólise ácida provoca a quebra das ligações glicosídicas dos polímeros do amido reduzindo o peso molecular das moléculas de amilose e amilopectina. Ácidos sulfúrico e clorídrico podem ser utilizados por períodos de tempo prolongados para produzir amilodextrinas ‘Naegeli’ ou amidos lintnerizados, respectivamente (SRICHUWONG et al., 2005b). Atualmente, o tratamento ácido controlado tem sido muito utilizado como ferramenta para promover um melhor entendimento do arranjo estrutural dos grânulos de amido, pois produz amilodextrinas que mantêm a estrutura granular intacta e consiste de regiões cristalinas da amilopectina resistentes ao ácido.

Todos os amidos exibem dois estágios de hidrólise em função do tempo. Um mais rápido, em média durante os primeiros 8 dias, atribuída a degradação da região amorfa dos grânulos de amido e outro mais lento, entre 7 a 12 dias seguintes, atribuída à ação do ácido sobre as regiões mais ordenadas (HOOVER, 2000). A maior resistência da região cristalina à

ação do ácido pode ser atribuída ao denso empacotamento das cadeias de amilopectina formando os cristais que não permitem a penetração de íons de hidrogênio, mesmo sob efeito de solvatação (HOOVER, 2000; JACOBS; DELCOUR, 1998a). A resistência da região cristalina também pode ocorrer devido à necessidade de uma mudança na conformação da unidade D-glucopiranosil de “cadeira” para “meia cadeira” para que o ácido possa hidrolisar as ligações glicosídicas. Se a estrutura cristalina imobiliza a conformação da unidade D-glucopiranosil, então esta mudança de conformação pode ser estericamente impossível (ROBIN et al., 1974; HOOVER, 2000).

Diferenças na taxa e extensão de hidrólise entre amidos têm sido atribuídas à diferenças no tamanho dos grânulos, extensão da interação das cadeias do amido nas regiões amorfas e cristalinas, e composição (extensão de fosforilação, teor de amilose e lipídeos complexados com as cadeias de amilose) (HOOVER, 2000).

Através de microscopia eletrônica de varredura, Atichokudomchai, Shobsngob e Varavinit (2000) verificaram que a hidrólise ácida do amido de mandioca provocou erosão da superfície dos grânulos, com aparente formação de poros. O teor de amilose diminuiu com o tempo de hidrólise, sugerindo que este polímero foi degradado a partir do interior dos grânulos de amido.

Os padrões de difração de raios-X e cristalinidade dos amidos também são afetados pela hidrólise ácida. Komiya, Yamada e Nara (1987), através de ‘Wide angle X-ray diffraction’ relataram aumento na cristalinidade com aumento do tempo de hidrólise, que foi atribuído à hidrólise preferencial das regiões amorfas. Já Jenkins e Donald (1997), através de ‘Small angle X-ray scattering’, observaram que com o aumento no tempo de hidrólise houve perda na definição dos picos. Entretanto, estes autores mostraram que, conforme o amido foi hidrolisado, houve uma diminuição na densidade eletrônica das lamelas amorfas, devido à corrosão das regiões amorfas. Essa redução foi mais pronunciada em períodos longos de hidrólise e foi atribuída a maior acessibilidade do fundo amorfo aos prótons hidratados.

Amidos padrão de difração de raios-X do tipo B são mais resistentes à hidrólise ácida do que amidos do tipo A (JACOBS et al., 1998a; SRICHUWONG et al., 2005b). No entanto, em amidos tipo A, devido à maior quantidade de cadeias curtas da amilopectina, os pontos de ramificação estão mais dispersos e alguns estão localizados nas lamelas cristalinas e estes ficam protegidos do ataque do ácido (JANE, 2006). A maior suscetibilidade dos amidos tipo A pode se devido à menor densidade da lamela cristalina provocada pela maior proporção de pontos de ramificação, o que permite ao ácido se difundir mais rapidamente (JANE, 2006;

SRICHUWONG et al., 2005b). Após hidrólise, ocorre o afastamento do espaço regular entre as lamelas cristalinas e amorfas, o que indica que cadeias longas que conectam mais de um 'cluster' são hidrolisadas a cadeias menores. As cadeias de amilose também são hidrolisadas a cadeias menores, uma vez que a afinidade do iodo pelo amido diminui (ROBIN et al., 1974; SRICHUWONG et al., 2005b). Desta forma, a distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina também pode afetar a extensão da hidrólise.

Estudos a partir de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência e detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) indicaram que geralmente amidos lintnerizados apresentam duas populações de cadeias principais. A primeira corresponde a cadeias lineares com DP 13-15 que provavelmente originaram das duplas hélices, enquanto que a segunda população consistiria principalmente de cadeias com uma única ramificação com DP 23-27 cuja ligação α -1,6 estaria protegida da ação do ácido (NAKAZAWA; WANG, 2003; VERMEYLEN et al., 2004). Srichuwong et al. (2005b) verificaram que após hidrólise ácida ocorreu uma redução na proporção de cadeias com DP 6 para amidos de inhame e batata, sugerindo que as cadeias curtas são rapidamente degradadas pelo ácido junto com o material amorfo, uma vez que elas não são longas o suficiente para formar duplas hélices estáveis.

1.3.1. Influência do 'annealing' na hidrólise ácida

Os dados encontrados na literatura a respeito do efeito do 'annealing' na suscetibilidade dos grânulos de amido à hidrólise ácida são dependentes da fonte botânica dos amidos. Alguns estudos relatam que o tratamento hidrotérmico tende a diminuir a porcentagem de hidrólise ácida, como observado por Jayakody et al. (2009) para amidos de inhame, por Hoover e Vasanthan (1994) para amidos de batata e trigo, e por Jacobs et al. (1998a) ao estudarem amidos de batata. Todos estes autores relataram que a maior resistência destes amidos à ação do ácido pode ser atribuída à formação de zonas mais organizadas após o 'annealing'. Jayakody et al. (2009) ainda sugeriram que durante o 'annealing' interações envolvendo cadeias de amilose (amilose/amilose e/ou amilose/amilopectina) ocorreram resultando em formação de cristais nas regiões amorfas. Desta forma, o acesso dos íons de hidrogênio aos oxigênios glicosídicos poderia ser bloqueado e isso diminuiria a suscetibilidade dos amidos à hidrólise ácida. Entretanto, Jacobs et al. (1998a) não observaram diferenças na suscetibilidade ácida de amidos de trigo e ervilha submetidos ao 'annealing'. Nos estudos realizados por Jacobs et al. (1998a), as diferenças na transição de temperatura de

gelatinização entre os amidos nativos e os submetidos ao ‘annealing’ praticamente desapareceram após a hidrólise ácida, sugerindo que as regiões amorfas dos grânulos de amido influenciaram as mudanças estruturais que ocorrem durante o ‘annealing’. Após o tratamento hidrotérmico, os autores observaram que a distribuição de cadeias ramificadas da amilopectina apresentou um maior DP médio e uma ligeira maior proporção de cadeias com uma única ramificação (DP 22-30) em relação a cadeias lineares curtas (DP 10-18), sugerindo que o ‘annealing’ resultou em uma maior resistência dos pontos de ramificação à ação do ácido.

Por outro lado, Tester, Debon e Karkalas (1998), estudando a hidrólise ácida de amidos de trigo nativo e submetido ao ‘annealing’, observaram que na primeira fase da hidrólise (0 a 7 dias, representando a hidrólise da região amorfa), o amido modificado foi mais extensivamente hidrolisado do que o amido nativo. Após 7 dias, quando o material cristalino passou a ser progressivamente hidrolisado, a extensão da hidrólise, tanto para o amido nativo quanto para o modificado, foi essencialmente a mesma. Observações semelhantes foram feitas por Lan et al. (2008) para amidos de trigo normal, trigo ceroso e trigo com alto teor de amilose. Os autores concluíram que após o ‘annealing’ a região amorfa se tornou mais isolada em função do aumento da estrutura vítrea. No entanto, a similaridade no padrão de hidrólise da fase cristalina desses amidos sugeriu que as duplas hélices (que se mantiveram constantes) desempenharam papel fundamental para o perfil de hidrólise nesta fase.

Durante todo o período de hidrólise, Nakazawa e Wang (2003), que estudaram amidos de milho normal, milho ceroso, milho com altos teores de amilose (50 e 70%), trigo, batata e mandioca, relataram que após ‘annealing’, houve aumento na suscetibilidade dos amidos à ação do ácido sulfúrico para a produção de dextrinas Naegeli durante todo o período de hidrólise. Este aumento variou de 1,0% para o amido de milho com teor de amilose de 50% a 14,3% para o amido de batata. Os autores atribuíram a maior suscetibilidade dos amidos ao ácido à maior porosidade da superfície granular dos amidos e à formação de espaços vazios na lamela cristalina provocados por uma otimização na perfeição dos cristais após ‘annealing’, o que permitiu uma hidrólise mais rápida. Esta otimização na perfeição dos cristais também teria um efeito protetor sobre os pontos de ramificação, como sugerido por Jacobs et al. (1998a).

1.4. Hidrólise enzimática do amido granular

Grânulos de amidos nativos são essencialmente resistentes à hidrólise por amilases. Amidos de diferentes fontes botânicas respondem de maneira distinta à ação enzimática (HOOVER; ZHOU, 2003; TESTER; QI; KARKALAS, 2006; ROCHA; CARNEIRO; FRANCO, 2010). Vários fatores contribuem para a relativa resistência dos grânulos de amido às amilases, entre eles o sistema enzimático utilizado, as condições da hidrólise (concentração, pH, temperatura, etc.), o isolamento físico do grânulo por paredes celulares espessas, a porosidade, o tamanho do grânulo, a extensão da associação molecular entre os componentes do amido, a fração de amilose e amilopectina, o complexo amilose-lipídeo e o tipo de cristalinidade polimórfica (A, B, ou C) (COLONNA; BULÉON; LEMANE, 1988; HOOVER; ZHOU, 2003; LI et al., 2004; TESTER; QI; KARKALAS, 2006).

A reação enzimática nos amidos granulares envolve a difusão da enzima na superfície dos grânulos, a adsorção e finalmente a catálise. A porosidade e a acessibilidade da superfície do grânulo praticamente controlam o número de sítios de adsorção (OATES, 1997). Para amidos que naturalmente apresentam poros em sua superfície, a difusão e adsorção das enzimas são facilitadas e a hidrólise se processa mais rapidamente (SUJKA; JAMROZ, 2007). O ataque inicial das enzimas nos grânulos de amido é, na maioria das vezes, superficial e dependente do tipo de amido. A adsorção da enzima na superfície dos grânulos de amidos não implica na ocorrência de ação catalítica. Apesar dos grânulos de amidos de milho normal e milho ceroso apresentarem características morfológicas semelhantes, a adsorção de amilases ocorre em diferentes extensões. As enzimas são adsorvidas nos grânulos do amido de milho ceroso com maior eficiência do que no amido de milho normal, entretanto, a taxa de solubilização dos dois amidos é similar (OATES, 1997).

Kimura e Robyt (1995), após hidrólise utilizando amiloglucosidase, observaram que o amido de milho ceroso apresentou superfície parecida com um queijo suíço, com inúmeros orifícios profundos. Já amidos de milho normal e mandioca apresentaram apenas erosões na superfície. Orifícios profundos só foram observados nestes amidos após aumento de cem vezes a quantidade inicial de enzima. O amido de batata apresentou apenas pequenos orifícios mesmo após o aumento na quantidade de enzima.

A hidrólise das ligações α -1,4 catalisada por enzimas envolve uma distorção da unidade D-glucopiranosil da conformação de ‘cadeira’ para ‘meia cadeira’ induzida pela enzima. Esta distorção reduz a entalpia de ativação e aumenta a suscetibilidade dos resíduos D-glucosil ao ataque nucleofílico dos grupos funcionais da enzima. A habilidade das amilases

de desestruturar as duplas hélices é dada pela distorção das unidades ao redor. Cadeias que apresentam mobilidade limitada, ou por complexação ou por formarem cristais, são hidrolisadas mais lentamente, pois suas unidades de glicose estão mais firmemente presas numa configuração específica, mas com o tempo, as amilases conseguem desestabilizar as cadeias macromoleculares (OATES, 1997).

O padrão de ação da enzima sobre o amido granular ainda é controverso. Para Colonna, Buléon e Lemane (1988), ao contrário do que ocorre na hidrólise ácida, na hidrólise enzimática as regiões amorfas e cristalinas do amido são simultaneamente degradadas pela α -amilase e assim, não ocorre qualquer aumento na cristalinidade. No entanto, Jacobs et al. (1998a) sugeriram que a taxa de hidrólise enzimática de diferentes amidos, a exemplo da hidrólise ácida, segue duas fases distintas em função do tempo, em que na primeira ocorre uma acentuada velocidade de hidrólise devido à rápida degradação das regiões amorfas do grânulo, enquanto que na segunda fase o material cristalino passa a ser lentamente degradado e a velocidade de hidrólise cai tendendo a estabilização.

Amidos com cristalinidade polimórfica do tipo A são mais suscetíveis à hidrólise enzimática do que amidos com padrão do tipo B. Os cristais do tipo A, com duplas hélices mais curtas, são mais rapidamente hidrolisados pela α -amilase (SRICHUWONG et al., 2005a). Em amidos do tipo A, as cadeias curtas A e B na estrutura cristalina são menos estáveis e mais suscetíveis a rearranjos, enquanto que amidos do tipo B apresentam maior proporção de cadeias longas da amilopectina que se estendem por dois ou mais 'clusters' e estabilizam a estrutura interna dos grânulos, tornando-os mais resistentes a ação enzimática (JANE, 2006). A distribuição do comprimento de cadeias da amilopectina também influencia a digestibilidade à α -amilase de amidos de diferentes fontes botânicas. A hidrólise dos grânulos de amido foi positiva e negativamente correlacionada com a proporção de cadeias com DP 8-12 e DP 16-26, respectivamente (SRICHUWONG et al., 2005a).

Duas são as enzimas mais comumente usadas na hidrólise: α -amilase e amiloglucosidase (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998). Os modos de ação das enzimas amilolíticas as classificam em endo e exo enzimas (ROBERTSON et al., 2006). A enzima α -amilase (1,4- α -D-glucan glicanohidrolase, EC 3.2.1.1) é uma endo enzima que age sobre o amido de maneira essencialmente aleatória, no interior da cadeia, através da hidrólise somente de ligações glicosídicas α -1,4, produzindo açúcares redutores (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LOPÉZ, 1995). Já a amiloglucosidase é uma exo enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 e deste modo produzir uma conversão de

100% do amido em D-glicose (KIM; ROBYT, 1999).

Estudos relatam que bons resultados são obtidos na digestão de amidos nativos através do sinergismo de endo e exo enzimas (FIORETTO et al., 2001; SONI; KAUR; GUPTA, 2003). Quando a amiloglucosidase age sozinha não há mudança no número de sítios do substrato até a amilose ou amilopectina serem digeridas a seus últimos resíduos. Quando as enzimas α -amilase e amiloglucosidase agem juntas, a ação endo-catalítica aumenta o número de sítios do substrato para a ação da exo enzima, permitindo um aumento na taxa de conversão. Num estágio inicial de hidrólise, as ações catalíticas das enzimas podem permitir a desintegração física da estrutura e, conseqüentemente, exporem novos sítios suscetíveis à ação de ambas as enzimas (ROBERTSON et al., 2006).

Conforme observado por Aggarwal e Dollimore (1998), em amidos de milho, trigo, arroz e batata parcialmente hidrolisados por amiloglucosidase ocorreu a formação de grânulos porosos que apresentaram maiores temperaturas de gelatinização do que os grânulos nativos. Estes autores sugeriram que os amidos tratados com amiloglucosidase apresentaram um aumento relativo de grânulos menores após hidrólise, o que pode ter provocado o aumento nas temperaturas de gelatinização. Já em outro estudo, Rocha, Carneiro e Franco (2010) observaram que as temperaturas de gelatinização e variações de entalpia de amidos de mandioca, batata doce, mandioquinha-salsa e batata parcialmente hidrolisados por α -amilase permaneceram similares às dos amidos nativos, sugerindo que a hidrólise ocorreu simultaneamente nas regiões amorfas e cristalinas dos grânulos. No entanto, Tester, Qi e Karkalas (2006) sugeriram que é possível que a α -amilase penetre no interior dos grânulos de amido e desta forma, hidrolise preferencialmente as regiões amorfas. Entretanto, este evento não ocorreria nos primeiros estágios da hidrólise.

1.4.1. Influência do ‘annealing’ na hidrólise enzimática

Os dados apresentados na literatura mostram que o impacto do ‘annealing’ sobre a suscetibilidade à hidrólise enzimática de amidos, a exemplo da hidrólise ácida, também é controverso. Segundo Wang, Powell e Oates (1997), amidos de sagu submetidos ao ‘annealing’ são hidrolisados mais facilmente que os amidos nativos. Por outro lado, Hoover e Vasanthan (1994) observaram para amidos de trigo, lentilha e batata redução na suscetibilidade enzimática. Lan et al. (2008) também observaram redução no grau de degradação por enzimas para amidos de trigo normal e trigo com alto teor de amilose após

‘annealing’, entretanto, observaram ligeiro aumento na degradação do amido de trigo ceroso. Em estudo realizado por Jacobs et al. (1998c), o ‘annealing’ aumentou a resistência dos amidos de trigo, ervilha e batata à ação enzimática durante a primeira fase de hidrólise (rápida) e aumentou a extensão de degradação dos amidos de trigo e ervilha durante a segunda fase (lenta). Entretanto, o amido de batata submetido ao ‘annealing’ foi mais resistente do que o amido nativo na segunda fase de hidrólise. Segundo esses autores, o comportamento dos amidos submetidos ao annealing frente às enzimas nas diferentes fases da hidrólise é função da origem botânica do amido e/ou tipo de cristal do amido. As modificações nas zonas cristalinas e amorfas e alterações das interações entre os cristais e as regiões amorfas dos grânulos que ocorrem durante o tratamento hidrotérmico são responsáveis por essas diferenças.

Mais recentemente, Chung, Liu e Hoover (2009), estudando amidos de ervilha, lentilha e milho normal, verificaram que o ‘annealing’ provocou aumento no nível de amido resistente (AR), diminuiu o nível de amido de digestão lenta (ADL) e aumentou o nível de amido de digestão rápida (ADR). O aumento no nível de AR foi atribuído às interações entre cadeias de amilose ou amilose/amilopectina, enquanto que o aumento no nível de ADR foi atribuído à formação de uma estrutura mais porosa que permitiu a ação das enzimas hidrolíticas no interior dos grânulos.

A reordenação provocada pelo ‘annealing’ pode resultar em ruptura de ligações de hidrogênio entre as regiões amorfas e cristalinas, causando uma ligeira expansão das regiões amorfas que provocaria o aparecimento de poros e fissuras (WANG; POWELL; OATES, 1997). Assim, mesmo que as lamelas amorfas e cristalinas do grânulo se tornem mais ordenadas com o tratamento hidrotérmico, o acesso das enzimas ao interior dos grânulos seria facilitado (O’BRIEN; WANG, 2008). Entretanto, foi constatado através de SAXS que o ‘annealing’ não alterou a distância entre as lamelas amorfas e cristalinas de amidos de trigo e batata (Jacobs et al., 1998b), porém, houve evidências da formação de poros e fissuras após o tratamento hidrotérmico. Estudos com amidos de mandioca (SERRANO; FRANCO, 2005) e mais recentemente com amidos de milho normal, milho ceroso e milho com altos teores de amilose (50 e 70%) (O’BRIEN; WANG, 2008) sustentam a hipótese de que o aumento na suscetibilidade dos amidos à hidrólise enzimática após ‘annealing’ para alguns grânulos seja devido, principalmente, ao aparecimento de poros e fissuras na superfície dos grânulos, provocados pelo tratamento hidrotérmico que facilitariam a penetração de enzimas.

1.5. CONCLUSÃO

A estrutura granular dos amidos é dependente da origem botânica, além das condições ambientais em que a planta é desenvolvida. Desta forma, ainda não foi possível estabelecer um modelo de estrutura que represente todos os amidos devido à imensa diversidade de fontes existentes. Ao longo dos anos, os amidos foram classificados em função do tamanho granular e morfologia, do polimorfismo, da distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina, da resistência às hidrólises ácida e enzimática, entre outros. Estas características estão relacionadas à estrutura química e à localização das moléculas de amilose e amilopectina no grânulo de amido. Esta revisão mostrou que um melhor entendimento sobre o mecanismo do tratamento hidrotérmico ‘annealing’ e da sua influência na ação de ácidos e enzimas no amido granular pode permitir a obtenção de mais informações relevantes a respeito das características estruturais dos amidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, v. 319, n. 1-2, p. 17-25, 1998.
- ATICHOKUDOMCHAI, N.; SHOBSNGOB, S.; VARAVINIT, S. Morphological properties of acid-modified tapioca starch. **Stach/Stärke**, v. 52, n. 8-9, p. 283-289, 2000.
- BILIADERIS, C. G. Structural transitions and related physical properties of starch. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and technology**. Burlington: Academic Press. 2009. p. 293-372. 3a. ed.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.
- CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 4, p. 251-261, 1997.
- CHUNG, H. J.; LIU, Q.; HOOVER, R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, P. 436-447, 2009.
- COLONNA, P.; BULÉON, A.; LEMANE, F. Action of bacillus subtilis α -amylase on native wheat starch. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 9, p. 895-904, 1988.
- FIORETTO, A. M. C.; et al. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. v. 4; p. 280-291; 2001.
- FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 1048-1061, 1973.
- FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHAL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. London: Academic Press. 1984. p. 183-247. 2ª ed.

GALLANT, D. J.; BEWA, H. ; BUY, Q. H. ; BOUCHET, B. ; SZYLIT, O. ; SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v. 34, n. 8, p. 255-262, 1982.

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.; NODA, T. ; KOLTISHEVA, G. I. ; WASSERMAN, L. A.; TESTER, R. F.; YURYEV, V. P. Effects of growth temperature on some structural properties of crystalline lamellae in starches extracted from sweet potatoes (*Sunnyred* and *Ayamurasaki*). **Starch/Stärke**, v. 55, n. 8, p. 350-357, 2003.

GENKINA, N. K.; WASSERMAN, L. A.; NODA, T.; TESTER, R. F.; YURYEV, V. P. Effects of annealing on the polymorphic structure of starches from sweet potatoes (*Ayamurasaki* and *Sunnyred* cultivars) grown at various soil temperatures. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1093-1098, 2004.

GENKINA, N. K.; WASSERMAN, L. A.; YURYEV, V. P. Annealing of starches from potato tubers grown at different environmental temperatures. Effect of heating duration. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 367-370, 2004.

GUSMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amilolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 373-403, 1995.

HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; ABE, J.; HANASHIRO, I.; MATSUNOBU, G.; KIYOTA, H. Analytical developments: Molecular and microstructural characterization. In: FRAZIER, P. J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. **Starch: Structure and Functionality**. London: Royal Society of Chemistry. 1997. p. 121-128.

HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; YASUDA, M. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. **Carbohydrate Research**, v. 94, n. 2, p. 205-209, 1981.

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.

HOOVER, R.; ZHOU, Y. In vitro and in vivo hydrolysis of starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 401-417, 2003.

IMBERTY, A.; CHANZY, H.; PEREZ, S.; BULÉON, A.; TRAN, V. The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. **Journal of Molecular Biology**, v. 201, n. 2, p. 365-378, 1988.

JACOBS, H.; DELCOUR, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 2895-2904, 1998.

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, 1998a.

JACOBS, H.; MISCHENKO, N.; KOCH, M. H. J.; EERLINGEN, R. C.; DELCOUR, J. A.; REYNAERS, H. Evaluation of the impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato starches: A differential scanning calorimetry and small angle X-ray scattering study. **Carbohydrate Research**, v. 306, n. 1-2, p. 1-10, 1998b.

JACOBS, H.; EERLINGEN, R. C.; SPAEPEN, H.; GROBET, P. J.; DELCOUR, J. A. Impact of annealing on the susceptibility of wheat, potato and pea starches to hydrolysis with pancreatin. **Carbohydrate Research**, v. 305, n. 2, p. 193-207, 1998c.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205-213, 2006.

JANE, J. Structural features of starch granules II. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and**

technology. Burlington: Academic Press. 2009. p. 193-236. 3a. ed.

JANE, J. L.; CHEN, J. F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 60-65, 1992.

JANE, J.; XU, A.; RODOSOVLJIVIC, M.; SEIB, P. A. Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 4, p. 405-409, 1992.

JAYAKODY, L.; HOOVER, R. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 691-703, 2008.

JAYAKODY, L.; HOOVER, R.; LIU, Q.; DONNER, E. Studies on tuber III. Impact of annealing on the molecular structure, composition and physicochemical properties of yam (*Discorea* sp.) starches grown in Sri Lanka. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 145-153, 2009.

JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 7-8, p. 262-267, 1997.

KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Location of amylose in normal starch granules. II: Locations of phosphodiester cross-linking revealed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 282-287, 1994.

KIM, Y. K.; ROBYT, J. F. Enzyme modification of starch granules: in situ reaction of glucoamylase to give complete retention of D-glucose inside the granule. **Carbohydrate Research**, v. 318, n. 1-4, p. 129-134, 1999.

KIMURA, A.; ROBYT, J. F. Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase. **Carbohydrate Research**, v. 277, n. 1, p. 87-107, 1995.

KISELEVA, V. I.; GENKINA, N. K.; TESTER, R. F.; WASSERMAN, L. A.; POPOV, A. A.; YURYEV, V. P. Annealing of normal, low and high amylose starches extracted from barley cultivars grown under different environmental conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 157-168, 2004.

KISELEVA, V. I.; KRIVANDIN, A. V.; FORMAL, J.; BLASZCZAK, W.; JELINSKI, T.; YURYEV, V. P. Annealing of normal and mutant wheat starches. LM, SEM, DSC, and SAXS studies. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 1, p. 75-83, 2005.

KOMIYA, T.; YAMADA, T.; NARA, S. Crystallinity of acid-treated corn starch. **Starch/Stärke**, v. 39, n. 9, p. 308-311, 1987.

LAN, H.; HOOVER, R.; JAYAKODY, L.; LIU, Q.; BAGA, M.; ASARE, E. K.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Impact of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of normal, waxy and high amylose bread wheat starches. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 663-675, 2008.

LI, J. H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B. G. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 621-632, 2004.

LINEBACK, D. R. The starch granule: organization and properties. **Bakers Digest**, v. 58, n. 2, p. 16-21, 1984.

LINEBACK, D. R. Current concepts of starch structure and its impact on properties. **Journal of the Japanese Society of Starch Science**, v. 33, p. 80-88, 1986.

LIU, H.; YU, L.; SIMON, G.; DEAN, K.; CHEN, L. Effects of annealing on gelatinization and microstructures of corn starches with different amylose/amylopectin ratios. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 662-669, 2009.

MIZUKAMI, H.; TAKEDA, Y.; HIZUKIRI, S. The structure of the hot-water soluble components in the starch granules of new Japanese rice cultivars. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 4, p. 329-335, 1999.

NAKAZAWA, Y.; WANG, Y. J. Acid hydrolysis of native and annealed starches and branch-structure of their

- Naegeli dextrins. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 24, p. 2871-2882, 2003.
- O'BRIEN, S.; WANG, Y. Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 4, p. 597-607, 2008.
- OATES, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 11, p. 375-382, 1997.
- PEREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural features of starch granules I. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and technology**. Burlington: Academic Press. 2009. p. 149-192. 3a. ed.
- PERRY, P. A.; DONALD, A. M. SANS study of the distribution of water within the starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 31-39, 2000.
- PROTSEROV, V. A.; WASSERMAN, L. A.; TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; EZERNITSKAJA, M. G.; YURYEV, V. P. Thermodynamic and structural properties of starches extracted from potatoes grown at different environmental temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 271-279, 2002.
- ROBERTSON, G. H.; WONG, D. W. S.; LEE, C. C.; WAGSCHAL, K.; SMITH, M. R.; ORTS, W. J. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 353-365, 2006.
- ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.
- ROCHA, T. S.; CARNEIRO, A. P. A.; FRANCO, C. M. L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of different granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 540-547, 2010.
- SERRANO, P. O.; FRANCO, C. M. L. Modificação hidrotérmica ("annealing") e hidrólise enzimática do amido de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 220-232, 2005.
- SONI, S. K.; KAUR, A.; GUPTA, J. K. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 185-192, 2003.
- SRICHUWONG, S.; SUNARTI, T. C.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 529-538, 2005a.
- SRICHUWONG, S.; ISONOTO, 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, n. 3, p. 115-121, 2005b.
- SUJKA, M.; JAMROZ, J. Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. **International Agrophysics**, v. 21, n. 1, p. 107-113, 2007.
- TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; KARKALAS, J. Annealing of wheat starch. **Journal of Cereal Science**, v. 28, n. 3, p. 259-272, 1998.
- TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; SOMMERVILLE, M. D. Annealing of maize starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 3, p. 287-299, 2000.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.
- VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; DELCOUR, J. A. An X-ray study of hydrothermally treated potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 364-375, 2006.

WADUGE, R. N.; HOOVER, R.; VASANTHAN, T. Effect of annealing on the structure and physicochemical properties of barley starches of varying amylose content. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 59-77, 2006.

WANG, W. J.; POWELL, A. D.; OATES, C. G. Effect of annealing on the hydrolysis of sago starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 2-3, p. 195-202, 1997.

ZHUO, Z.; LIAO, C.; HUANG, C.; YU, J.; TZENG, Y. LO, W.; DONG, C.; CHUI, H.; HUANG, Y.; LAI, H.; CHU, S. Second harmonic generation imaging – A new method for unraveling molecular information of starch. **Journal of Structural Biology**, v. 171, p. 89-94, 2010.

Capítulo 2

Caracterização físico-química e estrutural de amidos de diferentes fontes botânicas

Thaís de Souza Rocha^a; Jay-lin Jane^b; Célia Maria Landi Franco^a

^a Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265; CEP: 15054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

^b Department of Food Science and Human Nutrition, 2312 Food Science Building, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar as características estruturais e físico-químicas de amidos de milho normal, milho ceroso, mandioca, mandioquinha-salsa e batata. Os amidos de mandioquinha-salsa e batata apresentaram maiores proporções de cadeias laterais muito longas ($DP > 37$) da amilopectina, que superestimou o teor de amilose aparente dos mesmos, e, juntamente com os altos teores de fósforo apresentados para estes amidos, contribuiu para as altas viscosidades de pico, observadas através de RVA. O amido de mandioquinha-salsa também apresentou alta proporção de cadeias muito curtas ($DP 6-12$), assim como os amidos de milho normal, milho ceroso e mandioca, e também apresentou ombros na distribuição das cadeias, como também apresentado para o amido de mandioca. Estes ombros na distribuição contribuíram para as baixas temperaturas de gelatinização desses amidos, avaliadas por DSC. Os maiores valores de ΔH e os menores valores de ΔT dos amidos de mandioquinha-salsa e batata indicaram maior perfeição dos cristais destes amidos. O amido de milho ceroso apresentou o menor teor de amilose absoluto (0,1%), seguido do amido de mandioquinha-salsa (9,1%). O maior teor de amilose foi observado para o amido de milho normal (20%), que também apresentou a menor massa molecular deste polímero, através de GPC. O padrão de difração dos amidos de milho normal e milho ceroso foi tipo A, do amido de mandioca foi tipo C_A , e dos amidos de batata e mandioquinha-salsa foi tipo B. Os resultados mostram que as características estruturais e físico-químicas dos amidos são dependentes da fonte botânica. Também mostraram que o amido de mandioquinha-salsa apresentou características estruturais singulares em relação aos outros amidos estudados.

1. INTRODUÇÃO

O amido é um carboidrato encontrado em abundância na natureza e é o principal fornecedor de energia consumida pelo homem. Este carboidrato apresenta ampla aplicação na indústria alimentícia, mas também é bastante utilizado nas indústrias químicas (LEONEL; CEREDA, 2002). As fontes mais importantes comercialmente de amido são os grãos de cereais, que contêm cerca de 40 a 90% de seu peso seco em amido, as leguminosas, com 30 a 70%, e os tubérculos com 65 a 85%, em base seca (CASALI; SEDYAMA, 1997, sendo os amidos de milho, mandioca e batata os de maior interesse comercial (SANTACRUZ et al., 2002). Estes amidos são normalmente modificados para serem aplicados em processos

industriais específicos. Atualmente existe uma preocupação de agências de saúde para aplicação de amidos modificados em alimentos (DEVI et al., 2009) e desta forma, vem crescendo o número de estudos sobre modificações físicas e aplicação de novas fontes botânicas de amidos.

As diversas aplicações dos amidos dependem das propriedades físico-químicas e funcionais que apresentam (BEMILLER, 1997). Estas propriedades são atribuídas às singularidades que os amidos apresentam em sistemas aquosos e variam com a sua origem biológica (SINGH et al., 2003). A maioria dos amidos consiste de dois tipos de glucanas, amilose e amilopectina, que estão arranjadas de maneira a formar uma estrutura de camadas com regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e a enzimas (BULÉON et al., 1998; JANE et al., 2002; TESTER; KARKALAS; QI, 2004; JANE, 2006; BERTO, 2007; SALMAN et al., 2009). Diferentes características morfológicas, reológicas, térmicas, de inchamento e solubilidade e de textura estão relacionadas às características estruturais dos grânulos de amido.

Os grânulos de amidos podem variar de tamanhos menores que 1 μm a tamanhos maiores que 100 μm e os formatos podem ser esféricos, ovais, poligonais, discoidais, truncados ou irregulares, dependendo da fonte botânica (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004; JANE, 2006). Diferenças estruturais já foram relacionadas com tamanho dos grânulos de amidos, por exemplo, o teor de amilose é mais alto em grânulos maior diâmetro (TAKEDA et al, 1999; LI et al, 2001), enquanto o teor de lipídeos é mais elevado em grânulos menor diâmetro (RAEKER et al, 1998; YONEMOTO; CALORI-DOMINGUES; FRANCO, 2007).

A estrutura molecular da amilopectina influencia as propriedades de gelatinização dos amidos. A amilopectina contribui para o inchamento dos grânulos, enquanto que a amilose e a presença de lipídeos o inibem (TESTER; MORRISON, 1990). Estudos realizado por Jane et al. (1999) com amidos de diferentes fontes botânicas revelaram que o comprimento e a distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina influenciam as temperaturas de gelatinização, variação de entalpia e propriedades de pasta. Desta forma, se faz necessária uma melhor compreensão da estrutura dos grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas, especialmente amidos de fontes não convencionais. O presente estudo teve o objetivo de avaliar as características estruturais e físico-químicas de amidos de cinco diferentes fontes botânicas, milho normal, milho ceroso, mandioca, mandioquinha-salsa e batata.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

As matérias-primas utilizadas neste projeto são raízes de mandioca (*Manihot esculenta*) da variedade Fécula Branca, adquiridas na cidade de Bady Bassit/SP e colhidas após 10 meses de plantio; raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) da variedade Amarela de Senador Amaral, adquiridas na cidade de Piraí do Sul/PR e colhidas após 9 meses de plantio; tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) da variedade Monalisa, adquiridos na cidade de Araxá/MG e colhidos após 4 meses de plantio; grãos de milho normal (*Zea mays*) variedade BR 106 da safra de 2006/2007, fornecidos pela EMBRAPA (Sete Lagoas/MG); e grãos de milho ceroso, híbrido denominado WxA504, plantado em fevereiro e colhido em julho de 2007 (safrinha), produzidos pela empresa de sementes Dow AgroSciences e fornecidos pela Corn Products do Brasil. Todos os reagentes utilizados foram puros para análise.

2.2. Métodos

2.2.1. Isolamento dos amidos

As raízes e tubérculos foram lavados para retirada das impurezas. Em seguida, foram descascados e cortados em cubos pequenos, moídos com água, na proporção de 1:1 (v:v), num liquidificador industrial de aço inox, com capacidade de 4 litros. O tempo de moagem foi de 40 segundos para todas as matérias-primas. A suspensão obtida pela moagem 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 mandioquinha-salsa, e 80 e 100 mesh (0,149 mm), no caso dos 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 segundos 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 horas, para decantação do amido. O amido foi recuperado por sifonação.

Com objetivo de se retirar maior quantidade de impurezas, o amido foi lavado com água destilada, até que o sobrenadante estivesse limpo. Então, foi recuperado por

centrifugação e seco em estufa com circulação de ar a temperatura de 40 °C, por 8 a 12 horas.

Para obtenção dos amidos de milho normal e ceroso, os grãos passaram pelo processo de moagem úmida descrito por Eckhoff et al. (1993) com modificações. 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 (± 1 °C) por 36 horas, 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 para separação do germe que foi removido com auxílio de telas de 14 e 16 mesh (1,41 e 1,19 mm). 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.

Para separar o amido da proteína, a densidade da suspensão obtida foi ajustada para 6 °Bé, com auxílio de um aerômetro de Baumé. 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 metros, 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 8 a 12 horas.

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. Composição química

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

2.2.3. Distribuição dos tamanhos dos grânulos

A distribuição dos tamanhos dos grânulos dos amidos foi realizada através de microscópio ótico acoplado à um sistema de análise de imagem ‘Image-pro-plus’ (Media

Cybernetics) como descrito por Peroni, Rocha e Franco (2006). Três lâminas de cada amido foram preparadas e 100 grânulos foram aleatoriamente medidos por lâmina.

2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura

Os amidos nativos, previamente desidratados com etanol, foram colocados em fita adesiva de carbono aderida a um disco metálico, submetidas à aplicação de uma camada de 20 nm de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operando a uma aceleração de voltagem de 10 a 20 kV. Imagens foram obtidas com aumento de 1.000 para o amido de batata e 2.000 vezes para os demais.

2.2.5. Teor de amilose

2.2.5.1. Isolamento das amilopectinas

As amilopectinas dos amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ foram isoladas seguindo método de Jane e Chen (1992). Foram agitados 50 mL de suspensões de 10% (p/v) de amido em DMSO 90% em banho de água fervente por 30 min e por mais 24h a temperatura ambiente. Adicionou-se 150 mL de etanol absoluto e o precipitado foi recuperado por centrifugação a 2000 g por 20 min. Adicionou-se ao precipitado 300 mL de água fervente e 60 mL de butanol e foi realizado um refluxo em banho de água fervente por 30 minutos. A amostra foi armazenada em recipiente pré-aquecido para permitir queda lenta da temperatura e formação do complexo amilose-1-butanol, que foi removido por centrifugação. Este processo foi repetido 6 vezes para purificação da amilopectina. A amilopectina foi recuperada por precipitação com etanol e seca a 40 °C em estufa com circulação de ar.

2.2.5.2. Determinação do teor de amilose aparente e absoluto

Os amidos nativos e amilopectinas isoladas foram previamente desengordurados conforme descrito por Franco et al. (2002). Amostras de 0,5 g de cada amostra foram dispersas em 25 mL de DMSO 90%, mantido em banho de água fervente com agitação por 1 hora e posteriormente resfriado e mantido sobre agitação a temperatura ambiente durante 24 horas. Aproximadamente 75 mL de etanol absoluto foi adicionado à suspensão para

precipitação do amido, que foi recuperado por centrifugação a 2800 g por 20 minutos. O amido foi novamente disperso em etanol absoluto, recuperado por filtração a vácuo e seco em estufa com circulação forçada de ar a 38 °C. A afinidade por iodo dos amidos e das amilopectinas foi determinada em um titulador potenciométrico automático (716 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland) conforme descrito por Kasemsuwan et al. (1995). O teor de amilose aparente foi calculado pela divisão das afinidades por iodo dos amidos desengordurados por 20% (TAKEDA; HIZUKURI, 1987). O teor de amilose absoluto foi calculado através do método de Kasemsuwan et al. (1995). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.6. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina através de eletroforese capilar de fluorescência

2.2.6.1. Isolamento das amilopectinas

A amilopectina dos amidos nativos foram isoladas seguindo método de Jane e Chen (1992) conforme descrito no item 2.2.5.1.

2.2.6.2. Desramificação das amostras com isoamilase

Suspensões de 4 mg de amilopectina em 2 mL de DMSO 90% foram agitados em banho de água fervente por 1h e por mais 16h a temperatura ambiente. Adicionou-se 10 mL de etanol absoluto e o precipitado foi recuperado por centrifugação a 2000 g por 20 min. O precipitado foi suspenso em 2 mL de H₂O e mantido em banho de água fervente por 30 min com agitação. Transferiu-se 80 µL desta suspensão para micro tubo de centrífuga e adicionou-se 18 µL de tampão acetato 0,05 M pH 3,5, 1 µL de solução de isoamilase (1000 U/mL), 1 µL de solução de azida 2% (p/v). A suspensão foi mantida a 40 °C por 16h e após este período, a enzima foi desnaturada mantendo a suspensão em banho de água fervente por 10 min.

2.2.6.3. Preparo das amostras desramificadas para eletroforese capilar de fluorescência

Evaporou-se 50 µl da suspensão preparada como descrito em 2.2.4.2 usando centrífuga

a vácuo a 40 °C durante 2h e adicionou-se 2 µL de 0,2 M APTS (8-amino-1,3,6-piyrenetrisulfonic acid, Sigma Chemical CO., EUA) e 2 µL de 1M NaBH₃CN (cianoborohidreto) à amostra seca. A mistura foi incubada a 40 °C por 16h e então, adicionou-se 46 µL de água deionizada. Uma alíquota de 10 µL foi diluída para 200 µL com água deionizada e utilizada.

2.2.6.4. Eletroforese capilar de fluorescência

A distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina marcadas com APTS foi analisada através de eletroforese capilar de fluorescência (P/ACE MDQ, Beckman Courter, Fullerton, USA) (MORREL; SAMUEL; O'SHEA, 1998). O capilar usado foi eCAPTM neutro revestido, de 50 µm de diâmetro e 50 cm de comprimento. A separação foi realizada com o tampão Gel Buffer-N (Beckman Courter, Fullerton, USA). As amostras foram introduzidas por injeção sobre pressão a 0,5 psi por 5 segundos. Maltohexaose e maltoheptaose foram usados como padrões de referência. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.7. Distribuição do tamanho molecular dos amidos através de cromatografia de permeação em gel (GPC)

Amostras dos amidos nativos foram preparadas seguindo procedimento de Song e Jane (2000). Uma alíquota (3,0 mL) contendo 9 mg de amido e 1 mg de glicose foi aplicado em uma coluna (1,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) empacotada com o gel Sepharose CL-2B, seguindo procedimento de Wang et al. (1993). As amostras foram eluídas de forma ascendente. O eluente consistia de NaCl (25mM) e NaOH (1mM) com um fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 2,5 mL cada foram coletadas a cada 5 min e submetidas à análise de carboidratos totais e teor de amilose através do método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al, 1956) e reação de coloração com iodo (JULIANO, 1971), respectivamente, para determinar o perfil de eluição dos amidos. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.8. Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade

As umidades dos amidos foram equilibradas em dessecador contendo solução de

BaCl₂ saturada (25 °C, $a_w = 0.9$) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X destes amidos foram determinados utilizando-se uma unidade RINT2000 Wide Angle Goniometer, com radiação de Cu, linha K, $L = 1,542 \text{ \AA}$. A velocidade de varredura foi de 1° por minuto e as condições de uso foram de 50Kv e 100 mA. A porcentagem de cristalinidade foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total seguindo método de Nara; Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA). Os gráficos foram suavizados utilizando o método 'Adjacent Averaging'. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.9. Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos nativos foram determinadas utilizando um Rápido Viscoanalisador (RVA-4, Newport Scientific, Austrália) de acordo com procedimento descrito por Franco et al. (2002), com modificações. Suspensões de amido (10% p/p, num total de 28 g) foram colocadas em recipientes de alumínio, próprios do equipamento, e acoplados ao RVA. No início da análise, o RVA foi mantido a 50 °C durante 1 minuto; após este tempo, aqueceu a uma razão de 6 °C/minuto até atingir 95 °C e permaneceu nesta temperatura por 5 minutos; então resfriou até 50 °C também a 6 °C/minuto e permaneceu nesta temperatura até o final da análise. São necessários 23 minutos para completar o experimento. Durante todo o experimento o RVA manteve as suspensões sob agitação a 160 rpm. O software Thermoclines for Windows, versão 2.2 (Newport Scientific, Austrália) foi utilizado para o processamento dos resultados. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

2.2.10. Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos foram determinadas utilizando um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, EUA) de acordo com método descrito por Franco et al. (2002), com modificações. Amostras de 2 mg (b. s.) dos amidos foram pesadas em pequenos recipientes de alumínio, próprios para o equipamento. Água deionizada (6 µL) foi adicionada e os recipientes foram selados em prensa universal (Perkin Elmer, EUA). Após os recipientes selados serem mantidos por 2 horas em temperatura ambiente, foram aquecidos a uma razão de 5 °C/minuto de 25 a 125 °C. Um recipiente de alumínio vazio

foi utilizado como referência. Cada recipiente de alumínio contendo a amostra de amido gelatinizado foi armazenado durante 15 dias a uma temperatura de 5 °C. As amostras foram então analisadas quanto às propriedades térmicas dos amidos retrogradados usando o mesmo aparelho e parâmetros. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia (ΔH) dos amidos foram determinadas utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.11. Análise estatística

O delineamento experimental adotado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por duas ou três repetições. O programa Statistica for Windows (v. 5.0, Statsoft, Tulsa, OK) foi utilizado abrangendo a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento dos amidos

Os amidos obtidos apresentaram-se como pós brancos sem qualquer impureza aparente. A extração dos amidos de raízes e tuberosas foi realizada a frio e assim alterações nas propriedades físico-químicas dos mesmos foram minimizadas.

Como a maior parte do amido de milho está concentrada no endosperma dos grãos, o isolamento do amido por moagem física apenas, resultaria em grânulos bastante danificados (PÉREZ; HAROS; SUAREZ, 2001). Para minimizar a obtenção de grânulos danificados e aumentar o rendimento de amido, a maceração prévia dos grãos de milho geralmente é aplicada. As condições normalmente utilizadas na etapa de maceração são temperaturas que variam de 45 a 55 °C; soluções aquosas de 0,1 a 0,2% de dióxido de enxofre e 0,5 a 1,5% de ácido láctico, por um período de 24 a 40 horas. Segundo Shandera e Jackson (1996), dentre estes parâmetros, a temperatura é a principal responsável por causar alterações nas propriedades físico-químicas dos amidos. É sabido que este processo pode causar o ‘annealing’ natural dos grânulos de amido (KRUEGER et al. 1987; SHANDERA; JACKSON, 1996; TESTER; DEBON, 2000; TESTER; DEBON; SOMMERVILLE, 2000). Neste trabalho, foi utilizada a temperatura de 43 °C na etapa de maceração do milho. Esta foi

a menor temperatura encontrada por Shandera e Jackson (1996) que permitiria a extração do amido tanto do endosperma vítreo quanto do farináceo e que menos afetaria as suas propriedades térmicas.

3.2. Composição química

A pureza dos amidos está relacionada com o teor de constituintes menores presentes em sua composição, em que baixos teores de lipídeos e cinzas e ausência de proteína aderida ao grânulo são desejáveis. A quantidade destas substâncias no amido é dependente da planta e também do processo de extração do amido.

Todas as amostras de amido apresentaram pequenas porcentagens destes constituintes (< 1%), indicando a eficiência dos processos de isolamento dos amidos em laboratório. Dentre os constituintes menores, as frações de lipídeos e fósforo são as mais importantes, pois influenciam nas propriedades funcionais dos amidos (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de lipídeos e de fósforo dos amidos das diferentes fontes botânicas (% em relação à matéria seca).

Teor	Amidos				
	Milho normal	Milho ceroso	Mandioca	Mand-salsa	Batata
Lipídeos	0,31 ^a	0,13 ^b	0,13 ^b	0,09 ^b	0,10 ^b
Fósforo	0,025 ^c	0,014 ^d	0,015 ^d	0,032 ^b	0,083 ^a

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} Determinado por diferença.

O teor de lipídeos dos amidos variou de 0,09 a 0,31%. Como era esperado, o amido de milho normal apresentou maior teor de lipídeos em relação aos demais. Morrison (1988) observou teor de lipídeos totais de 0,6 a 0,7% para amido de milho normal e 0,08% para amido de milho ceroso, valores diferentes dos encontrados neste trabalho (0,31 e 0,13%, respectivamente). É provável que o processo de isolamento dos amidos tenha influenciado estes resultados. Em amidos de cereais o teor de lipídeos está relacionado ao teor de amilose (MORRISON, 1988). Durante o isolamento do amido de milho, os lipídeos não são retirados com facilidade, pois a maioria se encontra esterificada com ácido fosfórico ou podem ainda estar associados à amilose (NELLES et al., 2000). Assim, é bastante compreensível que em amidos cerosos o teor de lipídeos seja menor do que no amido normal (MORRISON, 1988). Amidos de raízes e tubérculos geralmente apresentam quantidades traço de lipídeos

(HOOVER, 2001) e desta forma, estão menos sujeitos a complexações.

O fósforo pode ser encontrado nos amidos em três formas principais: monoéster fosfato, lisofosfolípídeos e fosfato inorgânico. Em amidos de cereais, o fósforo é encontrado principalmente na forma de lisofosfolípídeos, enquanto que em amidos de raízes e tubérculos, e em amidos cerosos, se encontra principalmente como monoéster fosfato e, em pequena quantidade, como fósforo inorgânico (KASEMSUWAN; JANE, 1996). Em raízes e tubérculos, o monoéster fosfato encontra-se ligado covalentemente ao amido (HOOVER, 2001; KASEMSUWAN; JANE, 1994), principalmente às moléculas de amilopectina (JANE; KASEMSUWAN; CHEN, 1996).

Os amidos que apresentaram os maiores teores de fósforo foram os de batata (0,083%) e mandioquinha-salsa (0,032%). O amido de batata apresentou valor próximo ao encontrado por Lim, Kasemsuwan e Jane (1994) (0,089%). Já o valor apresentado pelo amido de mandioquinha-salsa foi maior que os encontrados por Rocha, Demiate e Franco (2008) e Peroni (2003) (0,017% e 0,016%, respectivamente). As diferenças encontradas podem estar relacionadas às características ambientais e de solo onde a planta foi desenvolvida. Segundo Tester et al. (1999), para amidos de batata, o teor de fósforo aumenta conforme diminui a temperatura ambiente durante o desenvolvimento da planta.

O amido de milho normal apresentou teor de fósforo (0,025%), maior do que os encontrados por Kasemsuwan e Jane (1996) (0,019%) e por Nelles et al. (2000) (0,016%). O mesmo ocorreu com o amido de milho ceroso que apresentou teor de fósforo de 0,014%, maior do que o observado por Kasemsuwan e Jane (1996) (0,002%). Segundo Kasemsuwan e Jane (1996), através de determinação do teor de fósforo por método químico e por ressonância magnética nuclear, cerca de 70% do fósforo encontrado para amido de milho normal está na forma de lisofosfolípídeos, 21% está na forma de monoéster fosfato e 9% está na forma de fósforo inorgânico. Em amido de milho ceroso a presença de lisofosfolípídeos não foi detectada e este amido apresentou 70% do fósforo na forma de monoéster fosfato e o restante como fósforo inorgânico.

3.3. Morfologia e tamanho dos grânulos dos amidos

A forma (Figura 1) e tamanho dos grânulos dos amidos (Tabela 2) variaram de acordo com a fonte botânica. O tamanho médio dos grânulos dos amidos nativos variou de 9,72 µm para o amido de mandioca, a 23,06 µm para o amido de batata, que apresentou grânulos com

tamanhos superiores a 72 μm (Tabela 2).

Os amidos de milho normal e milho ceroso apresentaram formatos semelhantes, com grânulos circulares e poliédricos. Grânulos com formatos circulares com algumas extremidades convexas foram observados para o amido de mandioca. Para os grânulos de amido de mandioquinha-salsa, foram observados formatos circulares e irregulares, além de grânulos frágeis, que tendem a se separar em pedaços (Figura 1d ↓). Formatos predominantemente ovais foram observados para os grânulos de amido de batata.

Tabela 2. Tamanho dos grânulos dos amidos antes e após ‘annealing’.

Amidos	Tamanhos* (μm)		
	Menor	Maior	Média da população
Antes do ‘annealing’			
Milho normal	2,7	24,3	11,9 ^d
Milho ceroso	3,7	22,5	12,9 ^{cd}
Mandioca	1,1	23,5	9,7 ^d
Mand-salsa	6,1	41,6	20,0 ^{bc}
Batata	5,7	72,8	23,1 ^{ab}

^a Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); * Considerando o diâmetro maior de cada grânulo.

A superfície de alguns grânulos dos amidos de milho normal e milho ceroso apresentaram poros e depressões (Figura 1a e 1b ↓). Depressões também foram notadas na superfície dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa (Figura 1d ↓), enquanto que os amidos de mandioca e batata apresentaram superfícies lisas. Morfologias semelhantes foram observadas por Ferrini et al. (2008), Sujka e Jamroz (2007) e Jane et al. (1994), para os amidos de milho normal e milho ceroso, Ferrini et al. (2008) e Serrano e Franco (2005) para o amido de mandioca, Rocha, Demiate e Franco (2008), Vieira e Sarmento (2008) e Santacruz et al. (2002) para o amido de mandioquinha-salsa e Jane et al. (1994) para o amido de batata.

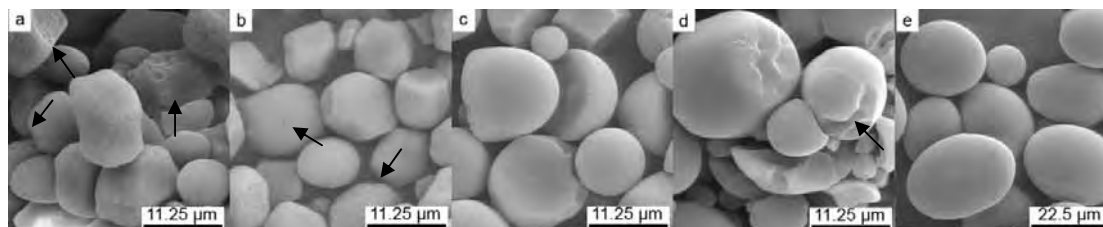


Figura 1. Microscopia eletrônico de varredura dos grânulos dos amidos: (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.

3.4. Teor de amilose

Os teores de amilose aparente e absoluto e as afinidades por iodo das amilopectinas e dos amidos integrais das diferentes fontes botânicas estão apresentados na Tabela 3. Cadeias longas das amilopectinas podem se complexar com iodo, assim como a amilose. Durante a titulação potenciométrica estes complexos desenvolvem coloração azul, o que aumenta o valor de afinidade por iodo e superestima o teor de amilose aparente dos amidos (JANE et al., 1999). Neste trabalho, todos os amidos apresentaram teor de amilose absoluto menor do que o teor de amilose aparente, com exceção do amido de milho ceroso que apresentou valores semelhantes, o que era esperado já que este amido é composto basicamente por moléculas de amilopectina.

O teor de amilose aparente do amido de milho normal foi similar aos encontrados por Freitas et al. (2004) (27,5%), Singh et al. (2003) (22,4 a 32,5%) e Jane et al. (1999) (29,4%). Este amido apresentou o maior teor de amilose absoluto (20,0%), sugerindo uma menor quantidade de cadeias muito longas (≥ 37) na amilopectina deste amido.

O amido de batata apresentou 30,4% de amilose aparente e 18,4% de amilose absoluto. 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%.

Tabela 3. Afinidade por iodo, teor de amilose aparente e absoluto dos amidos das diferentes fontes botânicas.

Amidos	Afinidade por iodo		Teor de amilose	
	Amido	Amilopectina	Aparente ¹	Absoluto ²
Milho normal	5,57	1,98	27,9 ^b	20,0 ^d
Milho ceroso	0,20	0,18	1,0 ^h	0,1 ^h
Mandioca	4,65	1,50	23,2 ^c	17,0 ^f
Mand-salsa	4,01	2,40	20,0 ^d	9,1 ^g
Batata	6,08	2,93	30,4 ^a	18,4 ^e

^a Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ¹ Calculado como: $C = 100 \times IA_S / 0,20$ onde C é a porcentagem de teor de amilose aparente e IA_S é a afinidade por iodo do amido integral desengordurado; ² Calculado como: $C = (IA_S - IA_{AP+IC}) / [0,20 - (IA_{AP+IC} / 100)]$ onde C é a porcentagem do teor de amilose absoluto, IA_S é a afinidade por iodo do amido integral desengordurado e IA_{AP+IC} é a afinidade por iodo da mistura de amilopectina e complexo intermediário.

O teor de amilose aparente do amido de mandioquinha-salsa foi de 20,0%, valor

similar aos obtidos por Rocha, Demiate e Franco (2008) e por Vieira e Sarmento (2008), baseados na complexação com iodo. No entanto, a afinidade por iodo da amilopectina isolada deste amido foi alta, próxima ao valor encontrado para o amido de batata. Isto indica que o amido de mandioquinha-salsa também apresenta grande proporção de cadeias muito longas da amilopectina. O teor de amilose absoluto deste amido foi de apenas 9,1%, próximo ao encontrado por Santacruz et al. (2002) através de cromatografia por exclusão de tamanho.

O amido de mandioca apresentou 23,2% de amilose aparente, concordando com resultados de Defloor, Dehing e Delcour (1998), que encontraram teor de amilose variando de 17,9 a 23,6%. O teor de amilose aparente deste amido também foi superestimado, mas em um nível menor do que o observado para os amidos de batata e mandioquinha-salsa e milho normal.

3.5. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina

Os perfis de distribuições dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina obtidos através de eletroforese capilar de fluorescência estão apresentados na Figura 2. Os diferentes comprimentos de cadeias laterais da amilopectina dos amidos foram divididos em 4 grupos (DP 6-12, DP 13-24, DP 25-36, e DP >37) conforme classificação de Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996). As áreas relativas totais foram usadas para calcular a porcentagem de distribuição e os resultados estão sumarizados na Tabela 4.

Os perfis de distribuição dos amidos de milho normal e milho ceroso foram parecidos (Figura 2a e 2b). Estes amidos apresentaram quantidade acentuada de cadeias com DP 9, pico no DP 15 e queda contínua a partir do DP 18, semelhante ao observado por Jane et al. (1999). Os perfis dos amidos de mandioca e mandioquinha-salsa também foram parecidos (Figura 2c e 2d). Estes amidos mostraram que do DP 6 ao 12, a quantidade de cadeias aumentava gradativamente formando um pico no DP 12. Um ombro na distribuição a partir do DP 18 foi observado para estes amidos, sendo mais acentuado para o amido de mandioquinha-salsa. Estes perfis estão de acordo com os obtidos por Jane et al. (1999) para o amido de mandioca, e por Santacruz et al. (2002) para o amido de mandioquinha-salsa. O amido de batata apresentou baixa quantidade de cadeias com DP 8 e o aumento na quantidade de cadeias só foi observado a partir do DP 9. Nenhum ombro na distribuição foi observado para este amido (Figura 2e). Perfil semelhante foi observado por Noda et al. 2004, Jane et al. (1999) e Hanashiro; Abe e Hizukuri (1996) para o amido de batata.

Ombros na distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina são indicativos de que cadeias muito curtas (DP <10), que não são hábeis a formar duplas hélices, podem estar localizadas nas regiões cristalinas como cadeias suspensas, produzindo defeitos na estrutura (GENKINA et al., 2007). A intensidade do ombro indicaria a proporção de cadeias curtas nos cristais que resultam nestes defeitos (JANE et al., 1999).

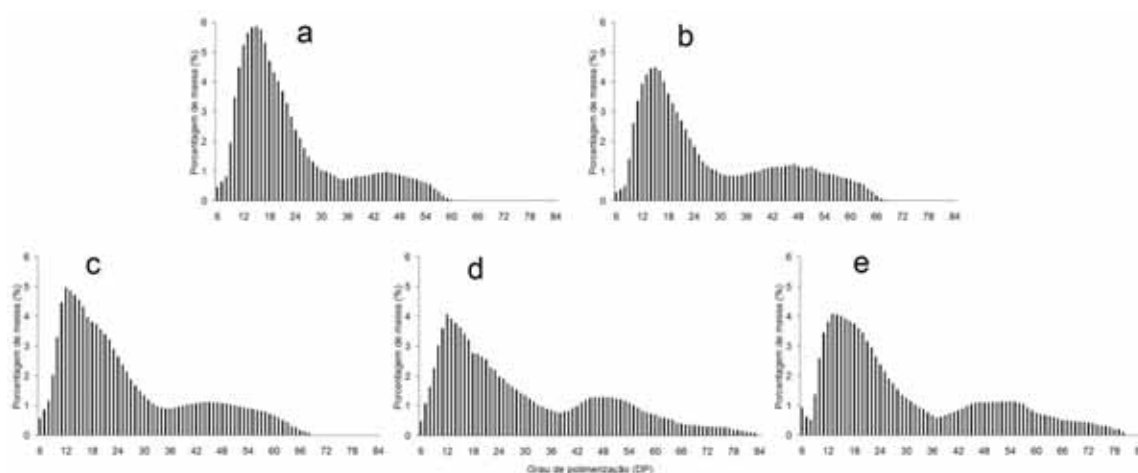


Figura 2. Perfis de distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos das diferentes fontes botânicas, através de eletroforese capilar de fluorescência. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.

Tabela 4. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos das diferentes fontes botânicas, através de eletroforese capilar de fluorescência.

Amidos	Distribuição (%)				DP médio	Maior DP detectado
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37		
Milho normal	17,1 ^a	53,5 ^a	12,8 ^c	16,6 ^d	22,7 ^d	60
Milho ceroso	15,5 ^b	50,3 ^b	14,0 ^b	20,2 ^c	24,4 ^c	64
Mandioca	17,6 ^a	45,6 ^c	15,6 ^a	21,2 ^c	24,7 ^c	68
Mand-salsa	16,2 ^{ab}	37,2 ^e	13,9 ^b	33,7 ^a	29,8 ^b	83
Batata	10,9 ^c	41,8 ^d	15,5 ^a	31,8 ^b	30,6 ^a	80

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina do amido de mandioquinha-salsa foi bastante peculiar. Este amido apresentou alta proporção de cadeias curtas (DP 6-12), valores semelhantes aos observados para os amidos de milho normal, milho ceroso e mandioca (Tabela 4). A menor proporção de cadeias com comprimento médio (DP

13-24) também foi observada para o amido de mandioquinha-salsa, além da maior proporção de cadeias muito longas, superando o valor encontrado para o amido de batata, que normalmente apresenta altas concentrações de cadeias muito longas (JANE et al., 1999). A alta proporção de cadeias curtas e a baixa proporção de cadeias com DP 13-36 apresentadas para o amido de mandioquinha-salsa podem ser provenientes de uma estrutura cristalina frágil, incapaz de manter os clusters unidos e conservar a integridade dos grânulos. Já a alta proporção de cadeias muito longas (DP >37) apresentada por este amido e para o amido de batata, provocou maiores alterações entre os teores de amilose aparente e amilose absoluto apresentados na Tabela 3.

3.6. Distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Os perfis de eluição dos amidos (Figura 3) apresentaram um primeiro pico correspondente à amilopectina, com grande massa molecular, que foi eluída no volume vazio da coluna (70 mL). O segundo pico, com alta resposta de 'blue value' (BV), correspondeu à amilose. A amilopectina de todos os amidos foi eluída no volume vazio da coluna.

O perfil de eluição do amido de milho normal (Figura 3a) mostrou um pico da amilose no volume 150 mL. A resposta de BV no pico da amilose deste amido foi alta e o pico mostrou-se bem definido, confirmando o seu alto teor de amilose absoluta (Tabela 3) e sugerindo a presença de moléculas mais homogêneas com massas moleculares semelhantes para este polímero. Para o amido de milho ceroso (Figura 3b) não foi observado qualquer pico para a amilose, o que já era esperado, pois este amido praticamente não continha amilose.

O amido de mandioca (Figura 3c) mostrou as moléculas de amilose sendo eluídas em volume menor (135 mL) que aquele do amido de milho normal, além de ter apresentado menor intensidade e formato mais largo. Esses resultados sugerem que as moléculas de amilose desse amido, quando comparadas às aquelas do amido de milho normal, se mostram mais heterogêneas e de maior massa molecular. O teor de amilose deste amido também é menor que o do amido de milho normal, como observado anteriormente (Tabela 3). Segundo Swinkels, (1985), o grau de polimerização da amilose depende da sua fonte botânica. Amidos de batata e mandioca contêm moléculas de amilose com alto grau de polimerização quando comparadas aos amidos de milho e trigo.

O amido de mandioquinha-salsa apresentou um pico de amilose pouco definido e

disperso sendo eluído no volume 137,5 mL (Figura 3d), indicando que a amilose deste amido apresenta massa molecular superior aquela do amido de milho normal. A amilose do amido de batata foi eluída no volume de 135 mL, da mesma forma como observado para o amido de mandioca.

A relação BV/CHO no pico da amilopectina dos amidos foi estabelecida. Quanto maior a relação BV/CHO no pico da amilopectina, maior a proporção de cadeias ramificadas longas da amilopectina (Franco et al., 2002). Para o amido de batata foi encontrada a maior relação (0,45), confirmando a alta proporção de cadeias muito longas deste amido (Tabela 4). No entanto, o amido de mandioquinha-salsa, que apresentou a maior proporção de cadeias longas, mostrou uma BV/CHO de apenas 0,28, valor igual ao observado para o amido de mandioca, provavelmente devido a este amido também ter apresentado alta proporção de cadeias curtas na sua amilopectina. Os amidos de milho normal e milho ceroso apresentaram uma razão BV/CHO de 0,30 e 0,17, respectivamente. Os dados obtidos de GPC não correspondem totalmente com o observado para a distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina, pois alguns amidos apresentaram um perfil inesperado, como foi o caso do amido de milho normal que mostrou esta relação muito alta.

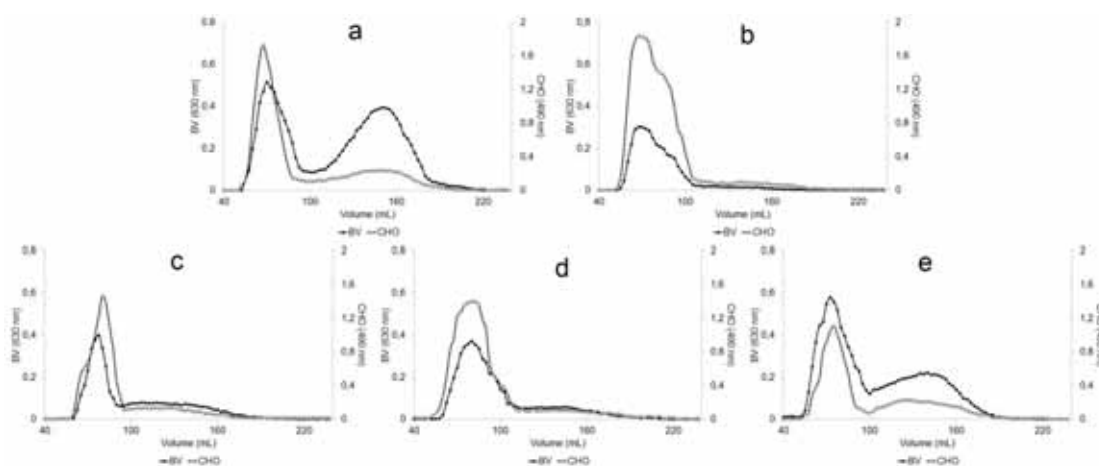


Figura 3. Perfil de eluição dos amidos nativos: (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.

3.7. Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade

Os padrões de difração de raios-X e as porcentagens de cristalinidade dos amidos das diferentes fontes botânicas estão apresentados na Figura 4.

Os amidos de milho normal e milho ceroso apresentaram padrão de difração do tipo A, concordando com o observado por outros autores (SAIBENE; SEETHARAMAN, 2006; JANE et al., 1999; HIZUKURI et al., 1997). Os amidos de mandioquinha-salsa e batata apresentaram padrão de difração de raios-X tipo B. O padrão tipo B também foi observado por Rocha, Demiate e Franco (2008), Vieira e Sarmento (2008) e Santacruz et al. (2002) para o amido de mandioquinha-salsa e por Hizukuri et al. (1997), McPherson e Jane (1999) e Jane et al. (1999) para o amido de batata. Segundo Hizukuri et al. (1983), a cristalinidade tipo B é típica para amidos que apresentam grande quantidade de cadeias ramificadas muito longas (DP >37) da amilopectina, como ocorreu para os amidos de mandioquinha-salsa e batata (Tabela 4). Já o amido de mandioca apresentou perfil de difração muito semelhante ao tipo A, entretanto, este amido exibiu também um pico a $5,5^\circ$ a 2θ que é típico para amidos tipo B. Desta forma, este amido pode ser classificado como C_A devido à maior semelhança dos picos com o padrão tipo A. MOORTHY (2002) e HOOVER (2001) Também reportaram padrão tipo C_A para o amido de mandioca, embora outros autores o classifiquem como tipo A (JANE et al., 1999; GALLANT et al., 1982).

Estudos realizados por Hizukuri et al. (1997) sugerem que os tipos de polimorfismos A, B ou C são determinados principalmente pelo comprimento médio das cadeias da amilopectina. Amidos com padrão tipo A apresentam grandes proporções de cadeias curtas com DP 6-12, amidos com padrão tipo B apresentam grandes proporções de cadeias muito longas (DP >37) e amidos com padrão tipo C apresentam quantidades substanciais de ambas as cadeias curtas e muito longas (JANE, 2006; JANE et al., 1999; CHEETHAM; TAO, 1998; HIZUKURI; KANEKO; TAKEDA, 1983). Poderia se esperar que o amido de mandioquinha-salsa apresentasse padrão tipo C, já que este amido continha quantidades substanciais tanto de cadeias curtas como de cadeias muito longas. Mas para este amido foi observado padrão tipo B, mostrando ser este uma exceção.

A porcentagem de cristalinidade foi maior para o amido de milho ceroso (41,4%) e menor para o amido de milho normal (32,6%) (Figura 4). Os valores encontrados na literatura estão próximos dos observados neste trabalho para os amidos de milho ceroso (CHEETHAM; TAO, 1998), mandioca (MOORTHY, 2002), mandioquinha-salsa (VIEIRA; SARMENTO, 2008) e batata (HOOVER, 2001). Os valores encontrados por Ferrini et al. (2008) e Wang, Truong e Wang (2003) para o amido de milho normal e por Rocha, Demiate e Franco (2008) para o amido de mandioquinha-salsa foram menores do que os obtidos aqui.

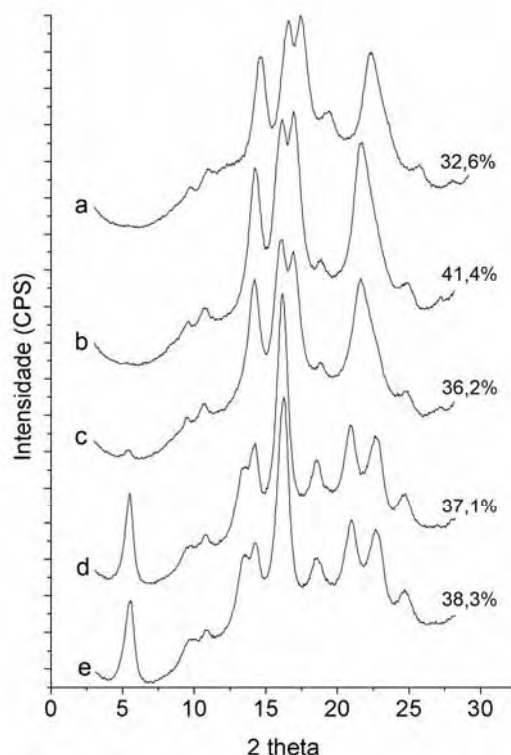


Figura 4. Difractogramas de raios-X dos amidos das diferentes fontes botânicas. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.

O grau de cristalinidade dos amidos aumenta significativamente com o aumento no teor de umidade. Embora os amidos apresentem o mesmo perfil de difração de raios-X, os picos se tornam mais pontiagudos e há uma diminuição da região amorfa (CHEETHAM; TAO, 1998). Desta forma, é difícil comparar os resultados com os encontrados na literatura, uma vez que a porcentagem de cristalinidade nos diferentes trabalhos tem sido determinada a diferentes teores de umidade, e em alguns casos os dados são publicados sem qualquer menção do teor de umidade na qual a medida foi realizada.

3.8. Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos das diferentes fontes botânicas estão mostradas na Tabela 5. O perfil viscoamilográfico de cada um dos amidos está apresentado na Figura 5. As temperaturas de pasta dos amidos diferiram significativamente, sendo maiores para os amidos de milho.

Tabela 5. Propriedades de pasta dos amidos das diferentes fontes botânicas.

Amidos	T. pasta (°C)	Viscosidades (RVU)			
		Pico	Quebra	Final	'Setback'
Milho normal	74,6 ^a	311 ^e	159 ^e	281 ^b	129 ^a
Milho ceroso	71,2 ^b	375 ^d	261 ^d	155 ^d	40 ^c
Mandioca	67,4 ^c	499 ^b	375 ^c	228 ^c	103 ^b
Mand-salsa	60,8 ^e	450 ^c	431 ^b	29 ^e	10 ^d
Batata	66,4 ^d	1000 ^a	690 ^a	350 ^a	41 ^c

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Como esperado, os amidos de raízes e tubérculos apresentaram maiores picos de viscosidade do que os amidos de cereais. O menor pico de viscosidade apresentado pelo amido de milho normal pode ser devido à influência de vários fatores, entre eles o alto teor de amilose e lipídeos, que reduzem o poder de inchamento dos grânulos e deste modo reduzem a viscosidade da pasta a quente. A presença de lisofosfolipídeos no amido de milho normal resulta em pastas com menores viscosidades e com maior opacidade, devido à tendência desses compostos de formarem complexos com a amilose e com cadeias ramificadas muito longas da amilopectina, resultando em um inchamento limitado. A ação da amilose no comportamento de gelatinização do amido é ao mesmo tempo diluente e inibidor do inchamento (SINGH et al.; 2003). Já moléculas de monoéster fosfato ligadas covalentemente à amilopectina de amidos de raízes e tubérculos, aumentam a viscosidade e a claridade da pasta (SINGH et al., 2003), como observado para o amido de batata e mandioquinha-salsa que apresentaram altos teores de fósforo (Tabela 1).

O amido de milho ceroso, composto basicamente por moléculas de amilopectina, apresentou maior pico de viscosidade do que o amido de milho normal, como era esperado.

As menores tendências a retrogradação ('setback') foram apresentadas pelos amidos de milho ceroso, mandioquinha-salsa e batata. A tendência a retrogradação está relacionada à capacidade da amilose em se reorganizar durante o resfriamento da pasta formando um gel. Estes resultados são bastante coerentes com os baixos teores de amilose observados para os amidos de milho ceroso e mandioquinha-salsa (Tabela 3). Outro fator que contribuiu para a menor tendência a retrogradação dos amidos, principalmente os de batata e mandioquinha-salsa, foi a presença de moléculas de monoéster fosfato ligadas covalentemente à amilopectina formando grupamentos iônicos que se repelem fisicamente dificultando a reorganização das cadeias e formação de gel (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003). Os baixos valores de 'setback' observados para os amidos de mandioquinha-salsa e batata ainda

confirmam a hipótese do teor de amilose destes amidos estarem superestimados, devido à alta proporção de cadeias ramificadas muito longas da amilopectina ($DP > 37$) apresentadas para estes amidos (Tabela 4).

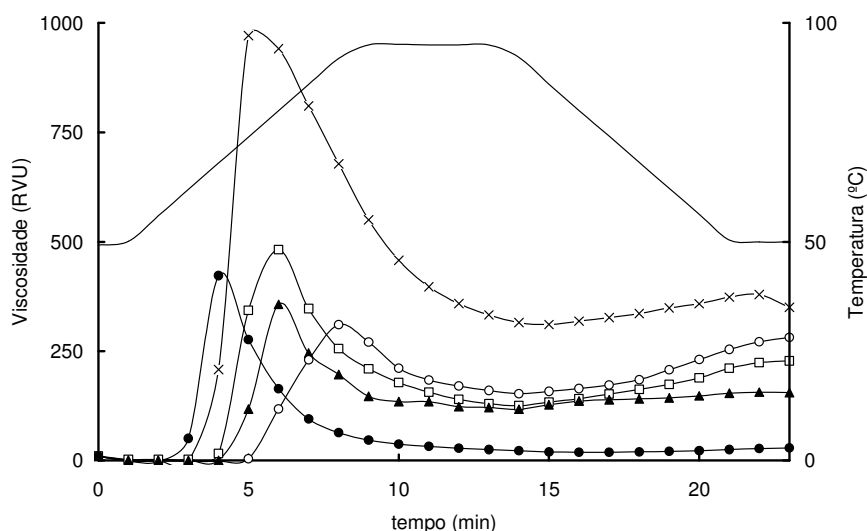


Figura 5. Perfil viscoamilográfico dos amidos das diferentes fontes botânicas. (○) milho normal; (▲) milho ceroso; (□) mandioca, (●) mandioquinha-salsa; (×) batata.

Todos os amidos apresentaram alta fragilidade frente à agitação mecânica e ao aquecimento, com exceção do amido de milho normal. O menor valor de quebra observado para este amido está relacionado ao inchamento limitado dos grânulos e também à formação do complexo amilose-lipídeo que aumenta a resistência da pasta ao cisalhamento (JANE et al., 1999).

3.9. Propriedades térmicas

O perfil endotérmico dos diferentes amidos e as temperaturas e entalpias de gelatinização estão mostrados na Figura 6 e Tabela 6, respectivamente. A gelatinização de muitos amidos granulares nativos envolve duas endotermas. A primeira depende da cristalinidade do grânulo de amido e a segunda está relacionada ao complexo amilose-lipídeo (TANG; WATANABE; MITSUNAGA, 2002). Dentre os amidos estudados, o único que apresentou endoterma para o complexo amilose-lipídeo foi o de milho normal. Isto indica que para os amidos das outras fontes botânicas estudadas, a amilose não se encontra complexada

com lipídeos, o que já era esperado, pois amidos de raízes e tubérculos não apresentam quantidades suficientes de lipídeos que permitam a formação de complexos, enquanto que no amido de milho ceroso, além da baixa concentração de lipídeos este amido apresentou baixo teor de amilose (0,1%).

Os amidos de milho normal e milho ceroso apresentaram os maiores valores de temperatura de gelatinização. Altas temperaturas de gelatinização estão relacionadas à estruturas cristalinas mais densamente empacotadas e à maior ordem molecular (SRICHUWONG et al., 2005) e também são apresentadas para amidos com padrão cristalino tipo A (JANE et al., 1999). Os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa apresentaram as menores temperaturas iniciais de gelatinização. Estes amidos também apresentaram ombros na distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina a partir do DP 18. Estes ombros podem ser considerados defeitos na estrutura cristalina causados pela alta quantidade de cadeias curtas que não são hábeis a formar duplas hélices, e desta forma, poderiam contribuir com as baixas temperaturas de gelatinização (JANE et al., 1999; GENKINA et al., 2007). Os amidos de mandioquinha-salsa e batata também apresentaram altos teores de fósforo (Tabela 1) o que também pode ter contribuído para as baixas temperaturas observadas. Como pode ser observado, vários são os fatores que afetam as propriedades térmicas dos amidos.

Tabela 6. Propriedades térmicas dos amidos das diferentes fontes botânicas.

Amidos	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
Milho normal	65,73 ^a	69,54 ^b	73,50 ^c	7,77	12,1 ^d
Milho ceroso	64,90 ^a	70,68 ^a	76,34 ^a	11,44	13,4 ^c
Mandioca	59,10 ^c	67,28 ^c	74,63 ^b	15,53	13,6 ^c
Mand-salsa	56,99 ^d	60,29 ^e	64,42 ^e	7,43	16,8 ^a
Batata	62,04 ^b	64,75 ^d	68,59 ^d	6,55	15,5 ^b
Complexo amilose-lipídeo					
Milho normal	92,40	98,16	102,71	10,31	0,4

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔT = T_f - T₀; ΔH = variação de entalpia.

De acordo com Tester (1997), a extensão da perfeição cristalina é refletida na faixa de temperatura de gelatinização e na variação de entalpia obtidas por DSC. Os amidos de mandioca e milho ceroso apresentaram as maiores faixas de temperatura de gelatinização, enquanto que os menores valores foram apresentados pelos amidos de mandioquinha-salsa e batata, os quais também apresentaram as maiores variações de entalpia (ΔH) sugerindo uma

maior perfeição e homogeneidade dos cristais para estes dois últimos amidos, como pode ser visualizado na Figura 6. Estes amidos também apresentaram as maiores proporções de cadeias com $DP > 37$. Amidos com cadeias ramificadas muito longas da amilopectina apresentam altos valores de ΔH , indicando que maior quantidade de energia é necessária para gelatinizar os cristais (JANE et al., 1999).

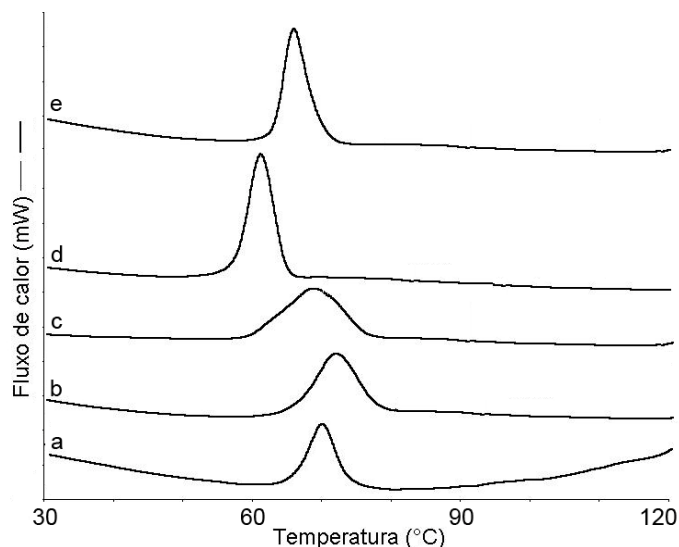


Figura 6. Perfil endotérmico observado por DSC dos amidos das diferentes fontes botânicas. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca; (d) mandioquinha-salsa; (e) batata.

O amido de milho normal apresentou o menor ΔH . Este amido também apresentou maior teor de amilose. Amidos com alto teor de amilose possuem mais regiões amorfas e menos regiões cristalinas e, portanto, menor energia é necessária para a fusão dos cristais (SINGH et al., 2003; SASAKI; YASUI; MATSUKI, 2000).

Após a gelatinização, ocorre uma agregação das moléculas de amido, conhecida como retrogradação. A recristalização que ocorre durante longos períodos de estocagem é atribuída às frações da amilopectina (SRICHUWONG et al., 2005). Os amidos retrogradados apresentaram diminuição das temperaturas de gelatinização (Tabela 7) em relação aos amidos nativos. Esta redução ocorre devido a um alinhamento impróprio das cadeias de amilopectina durante a reassociação, causando formação de estruturas cristalinas menos ordenadas e menos estáveis do que aquelas existentes no amido nativo (SRICHUWONG et al., 2005; KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000). Deste modo menor energia é requerida para fundir os cristais reestruturados.

Tabela 7. Propriedades térmicas dos amidos retrogradados.

Amidos	T ₀ [*] (°C)	T _p [*] (°C)	T _f [*] (°C)	ΔT [*] (°C)	ΔH [*] (J/g)	% R [*]
Milho normal	47,78 ^a	55,51 ^{ab}	62,78 ^{bc}	15,00	2,4 ^{cde}	19,8
Milho ceroso	43,96 ^{ab}	52,78 ^{ab}	61,78 ^{bc}	17,82	4,8 ^{ab}	35,8
Mandioca	44,35 ^{ab}	54,53 ^{ab}	60,83 ^c	16,48	2,3 ^{de}	16,9
Mand-salsa	43,36 ^{ab}	52,34 ^b	61,69 ^{bc}	18,33	1,93 ^e	11,3
Batata	44,16 ^{ab}	55,84 ^{ab}	67,94 ^a	22,86	4,2 ^{bcd}	27,1
Complexo amilose-lipídeo						
Milho normal	91,12	95,93	100,82	9,70	0,3	-

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔT = T_f - T₀; ΔH = variação de entalpia; % R = (ΔH_{ret}/ΔH_{gel}) x 100.

Altas taxas de retrogradação foram observadas para os amidos de milho ceroso e batata (35,8 e 27,1%, respectivamente). A taxa de retrogradação está diretamente relacionada ao grau de reassociação das cadeias ramificadas muito longas da amilopectina, e inversamente relacionada à fração de cadeias ramificadas curtas com DP 6-12 (JANE et al., 1999; SINGH et al. 2003). Desta forma, pode-se sugerir que amidos com maiores proporções de cadeias ramificadas muito longas da amilopectina apresentam as maiores taxas de retrogradação. Entretanto, a menor taxa de retrogradação apresentada pelo amido de mandioquinha-salsa, mesmo tendo este apresentado proporção de cadeias muito longas semelhante à do amido de batata, pode estar relacionada à alta quantidade de cadeias curtas observadas para este amido. Esta correlação foi confirmada neste trabalho já que os amidos de milho ceroso e batata apresentaram as menores proporções de cadeias com DP 6-12 e o amido de mandioquinha-salsa apresentou alta proporção de cadeias com estes comprimentos (Tabela 4).

4. CONCLUSÃO

Os resultados permitiram verificar que o amido de mandioquinha-salsa apresenta características estruturais peculiares, diferentes das dos outros amidos estudados. Este amido de fonte não convencional apresentou baixo teor de amilose, polimorfismo tipo B, grande quantidade tanto de cadeias laterais curtas como de cadeias laterais muito longas da amilopectina e grânulos frágeis e quebradiços provavelmente devido a uma estrutura cristalina frágil. Os amidos das diferentes fontes apresentaram diferenças nas características estruturais que resultaram em diferentes propriedades físico-químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC – Approved methods of the American association of cereal chemists. 7 ed.; 2 v.; St, Paul, Minnesota, 2000.
- BEMILLER, J.N. Starch modification: challenges and prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 4, p. 127-131, 1997.
- BERTOFT, E. Composition of building blocks in clusters from potato amylopectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 123-136, 2007.
- CASALI, V. W. D.; SEDYAMA, M. A. N. Origem e botânica da mandioquinha-salsa. **Informe Agropecuário**, v. 19, p. 13-14, 1997.
- 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.
- DEFLOOR, I.; DEHING, I.; DELCOUR, J. A. Physico-chemical properties of cassava starch. **Starch/Stärke**, v. 50, n. 2-3, p. 58-64, 1998.
- DEVI, A. F.; FIBRIANTO, K.; TORLEY, P.J.; BHANDARI, B. Physical properties of cryomilled rice starch. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 278-284, 2009.
- ECKHOFF, S. R.; RAUSH, K. D.; FOX, E. J.; TSO, C. C.; WU, X.; PAN, Z.; BURIK, P. A laboratory wet milling procedure to increase reproducibility and accuracy of products yields. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 723-727, 1993.
- FERRINI, L. M. K.; ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M., FRANCO, C. M. L. Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches. **Starch/Stärke**, v. 60, n. 8, p. 417-425, 2008.
- FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.
- FREITAS, R. A.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P. A.; ROCHA, S.; SIERAKOWSKI, M. R. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Discorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 3-8, 2004.
- GALLANT, D. J.; BEWA, H. ; BUY, Q. H. ; BOUCHET, B. ; SZYLIT, O. ; SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v. 34, n. 8, p. 255-262, 1982.
- 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.
- HANASHIRO, I.; ABE, J.; HIZUKURI, S. A periodic distribution of chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 283, p. 151-159, 1996.
- HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; ABE, J.; HANASHIRO, I.; MATSUNOBU, G.; KIYOTA, H. Analytical developments: Molecular and microstructural characterization. In: FRAZIER, P. J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. **Starch: Structure and Functionality**. London: Royal Society of Chemistry. 1997. p. 121-128.
- HIZUKURI, S.; KANEKO, T.; TAKEDA, Y. Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 760, n. 1, p. 188-191, 1983.
- 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.

- KRUEGER, B. R.; KNUTSON, C. A.; INGLETT, G. E.; WALKER, C. E. A differential scanning calorimetry on the effect of annealing on gelatinization behavior of corn starch. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 3, p. 715-718, 1987.
- JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, p. 205-213, 2006.
- JANE, J.; AO, Z.; DUVICK, S. A.; WIKLUND, M.; YOO, S.; WONG, K.; GARDNER, C. Structures of amylopectin and starch granules: how are they synthesized? **Journal of Applied Glycoscience**, v. 50, p. 167-172, 2003.
- JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 629-637, 1999.
- JANE, J. L.; CHEN, J. F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 60-65, 1992.
- JANE, J.; KASEMSUWAN, T.; CHEN, J. F. Phosphorous in rice and other starches. **Cereal Foods World**, v. 41, n. 11, p. 827-832, 1996.
- KARIM, A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 9-34, 2000.
- KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Location of amylose in normal starch granules. II: Locations of phosphodiester cross-linking revealed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 282-287, 1994.
- KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives and starch phospholipids by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 702-707, 1996.
- 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.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Características físico-químicas de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.
- LI, J. H.; VASANTHAN, T.; ROSSNAGEL, B.; HOOVER, R. Starch from hull-less barley: I. Granule morphology, composition and amylopectin structure. **Food Chemistry**, v. 74, p. 395-405, 2001.
- LIM, S. T.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. L. Characterization of phosphorous in starch by P-31 nuclear magnetic-resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 468-472, 1994.
- 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.
- MOORTHY, S. N. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 54, p. 559-592, 2002.
- MORREL, M. K.; SAMUEL, M. S.; O'SHEA, M. G. Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 2603-2611, 1998.
- MORRISON, W. R. Lipids 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.
- NELLES, E. M.; DEWAR, J.; BASON, M. L.; TAYLOR, R. N. Maize starch biphasic pasting curves. **Journal of Cereal Science**, v. 31, n. 3, p. 287-294, 2000.

- NODA, T.; TSUDA, S.; MORI, M.; TAKIGAWA, S.; ENDO, C. M.; SAITO, K.; MANGALIKA, W. H. A.; HANAOKA, A.; SUSUKI, Y.; YAMAUCHI, H. The effect of harvest date on the starch properties of various potato cultivars. **Food Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 119-125, 2004.
- PÉREZ, O. E.; HAROS, M.; SUAREZ, C. Corn sleeping: influence of time and lactic acid on isolation and thermal properties of starch. **Journal of Food Engineering**, v. 48, n. 3, p. 251-256, 2001.
- PERONI, F. H. G. Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas. 2003. Dissertação para obtenção de título de mestre, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto.
- RAEKER, M. O.; GAINES, C. S.; FINNEY, P. L.; DONELSON, T. Granule size distribution and chemical composition of starches from 12 soft wheat cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 721-728, 1998.
- ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.
- SAIBENE, D.; SEETHARAM, K. Segmental mobility of polymers in starch granules at low moisture contents. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 4, p. 539-547, 2006.
- SALMAN, H.; BLAZEK, J.; LOPES-RUBIO, A.; GILBERT, E. P.; HANLEY, T.; COPELAND, L. Structure-function relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 420-427, 2009.
- 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.
- SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starches from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 58-63, 2000.
- SHANDERA, D. L.; JACKSON, D. S. Effect of corn wet-milling conditions (sulfur dioxide, lactic acid, and steeping temperature) on starch functionality. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 5, p. 632-637, 1996.
- SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.
- 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.; SUNARTI, T. C.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 529-538, 2005.
- TAKEDA, Y.; TAKEDA, C.; MIZUKAMI, H.; HANASHIRO, I. Structures of large, medium and small starch granules of barley grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 109-114, 1999.
- TANG, H.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 217-224, 2002.
- TESTER, R. F. 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. Annealing of starch – a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n.1, p. 1-12, 2000.
- 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, n. 14, p. 2045-2051, 1999.

TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; SOMMERVILLE, M. D. Annealing of maize starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 3, p. 287-299, 2000.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose and lipid. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 551-557, 1990.

VIEIRA, F. C.; SARMENTO, S. B. S. Heat-moisture treatment and enzymatic digestibility of Peruvian carrot, sweet potato and ginger starches. **Starch/Stärke**, v. 60, n. 5, p. 223-232, 2008.

WANG, Y.; TRUONG, V.; WANG, L. Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 3, p. 327-333, 2003.

YONEMOTO, P. G.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; FRANCO, C. M. L. Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 761-771, 2007.

Capítulo 3

Structural characterization of Peruvian carrot (Arracacia xanthorrhiza) starch and effect of annealing on its semi-crystalline structure

T. S. ROCHA^a, V. A. G. CUNHA^a, J. JANE^b, C. M. L. FRANCO^a

^a Department of Food Technology and Engineering, UNESP – São Paulo State University, Rua Cristóvão Colombo, 2265; CEP: 15054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

^b Department of Food Science and Human Nutrition, 2312 Food Science Building, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA.

ABSTRACT

Structural characteristics of native and annealed Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starches were determined and compared to those of cassava and potato starches. Peruvian carrot starch presented round and irregular shaped granules, low amylose content and B-type X-ray pattern. The amylopectin of this starch contained a large proportion of long branched chains and a large proportion of short branched chains, which may contribute to its low gelatinization temperature. After annealing, the gelatinization temperatures of all starches increased, but the ΔH and the percentage of crystallinity increased only in Peruvian carrot and potato starches. The annealing process promoted a higher exposure of Peruvian carrot amylose molecules, which were more frequently attacked by enzymes, whereas amylopectin molecules became more resistant to hydrolysis. Peruvian carrot starch had structural characteristics that differed from those of cassava and potato starches. Annealing affected the semi-crystalline structure of this starch, enhancing its crystallinity, mainly due to a better interaction between amylopectin chains.

Keywords: Starch; arracacha; structure; amylose; amylopectin.

1 - INTRODUCTION

The demand for native starches from unconventional sources is increasing due to the interest in using native starches for food production instead of using chemically modified starches. Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) roots are a potential source of starch. Recent studies have been completed that characterize the functional properties of the Peruvian carrot starch for its use in the food industry. This starch formed clear pastes with high viscosity and low retrogradation and syneresis, along with low gelatinization temperature (Rocha et al., 2008; Santacruz et al., 2002; Vieira & Sarmiento, 2008). However, there is still little knowledge about its structural characteristics.

The structural characteristics of granular starches have been under investigation for the last several years. It is widely known that starch granules are composed mainly of amylose and amylopectin, which form a semi-crystalline structure with alternating higher and lower refractive indices, crystallinity, and resistance to acid and enzymes (Buléon et al., 1998). However, the location of amylose and amylopectin within the starch granules and how they are crystallized are still not completely understood. Due to their semi-crystalline structure, starch granules can undergo molecular reorganization when subjected to annealing. Annealing is a hydrothermal treatment during which suspensions of starch in water (> 60% w/w) are held for a set period of time at a temperature higher than the glass transition temperature but lower than the onset gelatinization temperature (Jacobs & Delcour, 1998). This simple technique causes significant changes in the physicochemical properties of starches without destroying their granular structure, and it can provide useful information toward the understanding of granular structure in general.

The molecular reorganization caused by annealing occurs due to an increase in amylose and amylopectin mobility in the presence of water. More pronounced effects are obtained at sub-gelatinization temperatures (Jacobs et al., 1998). The hydration of amorphous regions induces movements in both amorphous and crystalline domains, allowing the double helices to align in more organized layers (Biliaderis, 2009). This reorganization results in higher gelatinization temperatures and a narrowing of the gelatinization temperature range due to the higher granular stability obtained (Genkina et al., 2004; Jacobs & Delcour, 1998; Kiseleva et al., 2005). These changes have been extensively described, but there is still no consensus regarding the mechanism of the process of annealing. Some authors discuss it based on increased crystallinity and perfection of starch crystallites due to an optimization of

double helix packing and/or elongation of double helices from amylopectin chains (Genkina et al., 2004; Tester et al., 1998). Others have proposed new interactions between amylose/amylose, amylose/amylopectin and/or amylopectin/amylopectin (Chung et al., 2009; Hoover & Vasanthan, 1994).

The aims of this study were to determine the structural characteristics of Peruvian carrot starch when compared to those of cassava and potato starches. The annealing of starches was performed in order to aid in the understanding of the starch's granular structure and also to investigate the mechanism of action of this hydrothermal treatment.

2 – MATERIAL AND METHODS

2.1 – Material

Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) roots of the “Amarela de Senador Amaral” variety, cassava (*Manihot esculenta*) roots of the “Fécula Branca” variety, and potato (*Solanum tuberosum*) tubers of the “Monalisa” variety were used within 24 hours after harvesting. Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (A7420, Sigma Chemical Co., USA), α -amylase from *Bacillus* sp. (A6380, Sigma Chemical Co., USA) and isoamylase from *Pseudomonas* sp. (Megazyme International, Ireland) were used. All other chemicals used were analytical grade.

2.2 – Methods

2.2.1 – Isolation of starches

Starches from roots and tubers were isolated as described by Peroni et al. (2006).

2.2.2 – Annealing

Starches were subjected to one-step annealing, following the procedure of Jacobs et al. (1998), with modifications. Native starch samples, in triplicate, were suspended in water (5% w/v) and incubated in a thermostatically controlled water bath for 24 h at a temperature of approximately 3 °C below the onset gelatinization temperature of each starch (54 °C for Peruvian carrot, 56 °C for cassava, and 59 °C for potato starches). After that, the samples were vacuum filtered and air dried overnight at 38 °C.

2.2.3 – Amylopectin branch-chain length distribution

Amylopectin was fractionated from amylose using *n*-butanol and was then debranched using isoamylase, as described by Jane and Chen (1992). The debranched chains were labeled with 0.2 M aqueous 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulphonic acid (APTS) and 1 M aqueous sodium cyanoborohydride. The branched-chain length distribution was analyzed using Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis (P/ACE MDQ, Beckman Coulter, Fullerton, USA), according to Morrel et al. (1998). The capillary used was a 50- μ m-diameter eCAPTM that was neutral coated with the supplied carbohydrate separation Buffer-N Gel. The sample was introduced by pressure injection at 0.5 psi for 5 seconds. Maltohexaose and maltoheptaose were used as reference standards. The analysis was performed in duplicate.

2.2.4 – Wide-angle X-ray diffraction (WAXD)

Native and annealed starches were equilibrated in a desiccator containing saturated BaCl₂ solution (25 °C, aw= 0.9) for 10 days, and WAXD patterns were determined using a Wide Angle Goniometer unit (RINT2000, Rigaku, Tokyo, Japan), with copper K α radiation (λ = 0.1542 nm). The scanning speed was 1°/min at 50 kV and 100 mA. The relative crystallinity was quantitatively estimated based on the relationship between the peak and total areas following the method of Nara and Komiya (1983), using the Origin software (version 7.5, Microcal Inc., Northampton, USA). The analysis was performed in triplicate.

2.2.5 – Average amylopectin molar mass and gyration radius

Weight-average molar mass and the *z*-average gyration radius of amylopectin were determined using a HPSEC-MALLS-RI. Native and annealed starch samples were prepared as described by Yoo and Jane (2002). The HPSEC system consisted of an isocratic pump (HP 1050 series, Hewlett Packard, Valley Force, USA), a multi-angle laser light scattering detector (Dawn DSP-F, Wyatt Tech. Co., Santa Barbara, USA) and a refractive index detector (HP 1047A, Hewlett Packard, Valley Force, USA). To separate amylopectin from amylose, a Shodex OH pack KB-guard column and the KB-806 and KB-804 analytical columns (Showa Denko K.K., JM Science, Grand Island, USA) were used. Operating conditions and data analysis were the same as described by Yoo and Jane (2002), except that the flow rate used was 0.5 mL/min and the sample concentration was 0.15 mg/mL. The analysis was performed in duplicate.

2.2.6 – Amylose content and amylose leached

Amylose and amylopectin were separated according to Jane and Chen (1992). Iodine affinities of defatted starches and of isolated amylopectins were determined using an automatic potentiometric titrator (702 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland). Absolute amylose contents were calculated following the method of Kasemsuwan et al. (1995). The analysis was performed in triplicate.

Amylose that leached to the supernatant during annealing was evaluated following the procedure of Palav and Seetharaman (2006), with some modifications. An aliquot of the supernatant (0.05 mL) was treated with 0.25 mL of iodine solution (0.2% KI and 0.02% I₂). The blue color was quantified after 20 min at 630 nm using an absorbance microplate reader (ELx808, Bio-Tek, Winoosky, USA). Pure amylose (A0512, Sigma Chemical Co., USA) was used to prepare a standard curve. The analysis was performed in triplicate.

2.2.7 – Scanning electron microscopy

Native and annealed starches, rinsed with ethanol, were mounted on a metal plate covered with a carbon double sided adhesive tape, submitted to a 20 nm gold layer application and observed in a scanning electron microscope (DSM 960, Zeiss, Oberkochen, Germany) operating at an acceleration voltage of 20kV. Images were obtained with magnification of 1,000 and 2,000 times.

2.2.8 – Confocal scanning laser microscopy

Native and annealed starch suspensions (1% w/v) were stained with Rhodamine B (0.01% w/v), and a glass slide was mounted with a cover glass for viewing under a microscope, as described by Jane et al. (2004). A confocal laser-scanning microscope (CLSM) (TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was used with an Ar/Kr laser-light source. The excitation wavelength was 568 to 625 nm and the objective lens used was 100x/UV/oil immersion.

2.2.9 – Thermal properties

Gelatinization properties of starch samples were determined using a differential scanning calorimeter (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, Norwalk, USA) according to Franco et al.

(2002). The heating rate used was 5° C/min. The analysis was performed in triplicate.

2.2.10 – Enzymatic Hydrolysis

Native and annealed starches were hydrolyzed with α -amylase (40 SKB/g of starch) and amyloglucosidase (8 U/g of starch) according to Franco and Ciacco (1992), with modifications. Starch suspensions (10% w/v) were incubated at 37 °C for 120 h. The amount of reducing sugar in the supernatant was determined according to Somogyi (1945), every 6 hours. The enzymatic hydrolysis was interrupted following the procedure of Vieira and Sarmiento (2008), and the hydrolysis residues, which were collected after 12, 36 and 96 h, were air dried overnight at 38 °C. The amylose content and the molar mass of amylopectin after hydrolysis were determined as described above.

2.2.11 – Statistical analysis

The software Statistics for Windows (v. 5.0, Statsoft, Tulsa, OK) was used to analyze mean values using analysis of variance (ANOVA). Differences were evaluated using the t-test with Tukey's adjustment. The significance level was set at a p value < 0.05.

3 – RESULTS AND DISCUSSION

3.1 – Amylopectin branch-chain length distribution

Normalized chain length distributions of amylopectins isolated from Peruvian carrot, cassava and potato starches are shown in Figure 1, and the results are summarized in Table 1. Peruvian carrot starch (Figure 1a) had a gradual increase in chains of polymerization degree (DP) 6-12, and formed a peak at DP 12. This starch displayed a shoulder at DP 18-24. Cassava starch (Figure 1b) had a distribution similar to that of Peruvian carrot starch, but the relative intensity of the shoulder was lower, and there was a lower proportion of very long chains. These results are in agreement with those reported by Santacruz et al. (2002) for Peruvian carrot starch, and by Jane et al. (1999) for cassava starch. Shoulders on the branched-chain length distribution of amylopectins indicate that short chains (DP <10), unable to form double helices, might be located in crystalline regions, which would result in defects in starch structure (Genkina et al., 2007; Jane et al., 1999). The potato starch (Figure 1c) had the lowest population of chains with DP 8, and an increase in the chains population

was found at DP 9. This starch did not show a shoulder on its distribution. A similar distribution was found by Jane et al. (1999) and Noda et al. (2004) in potato starches.

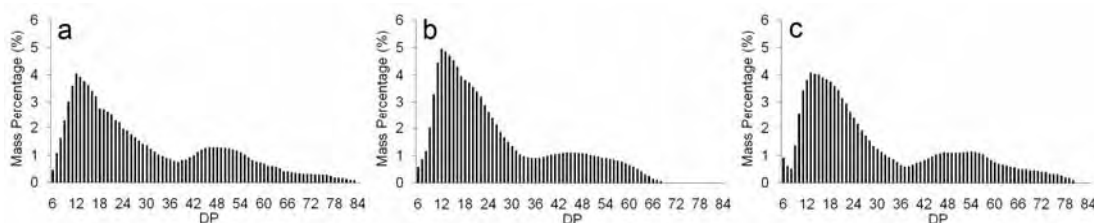


Figure 1. Branch-chain length distribution of amylopectins of (a) Peruvian carrot, (b) cassava, and (c) potato native starches.

Peruvian carrot starch had the largest proportion of very long chains (DP >37), followed by potato starch (Table 1). However, the average chain length of Peruvian carrot amylopectin was smaller than that of potato amylopectin due to the large proportion of short chains (DP 6-12) presented in this first one. The large proportion of short chains and the small proportion of chains of DP 13-36 of Peruvian carrot starch may arise from a weak crystalline structure, which is unable to hold the clusters together or maintain the integrity of starch granules, as observed by Jane et al. (2004) in the case of sugary-2 maize starch.

Table 1. Branch-chain length distribution of amylopectin of starches in mass-basis, measured by fluophore-assisted capillary electrophoresis.

Starches	Branch chain length distribution (%)				Average DP	Highest detectable DP
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37		
Before Annealing						
Peruvian carrot	16.2 ^b	37.2 ^c	13.9 ^b	33.7 ^a	29.8 ^b	83
Cassava	17.6 ^a	45.6 ^a	15.6 ^a	21.2 ^c	24.7 ^c	68
Potato	10.9 ^c	41.8 ^b	15.5 ^a	31.8 ^b	30.6 ^a	80
After Annealing						
Peruvian carrot	15.6 ^b	36.2 ^c	13.4 ^b	34.8 ^a	29.6 ^b	80
Cassava	18.3 ^a	44.9 ^a	14.6 ^{ab}	22.2 ^c	25.0 ^c	66
Potato	10.5 ^c	41.1 ^b	15.8 ^a	32.6 ^{ab}	30.3 ^{ab}	80

Values with the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Alterations on the branched-chain length distribution of amylopectins after annealing were not expected, since this treatment does not change the chemical structure of the starch

granules. The results shown in Table 1 confirm that the branched-chain length distribution of amylopectins remained unchanged in all starches. Similar results were found in normal, waxy, and high-amylose wheat starches after annealing at 10 °C below the onset gelatinization temperature for 72 h (Lan et al., 2008).

3.2 – X-ray pattern and crystallinity

Peruvian carrot starch showed a typical B-type X-ray pattern (Figure 2 a), result that agrees with those of Rocha et al. (2008), Santacruz et al. (2002) and Vieira and Sarmiento (2008). According to Hizukuri et al. (1983), the average DP of the branched chains of amylopectin largely determines whether the polymorphs are of A, B or C type. A-type starches consist of a large proportion of short chains (DP 6-12), B-type starches have a large proportion of long chains (DP > 37), and C-type starches have substantial amount of both short and long chains. Potato starch showed a B-type X-ray diffraction pattern (Figure 2 c), whereas cassava starch showed an X-ray diffraction pattern similar to A-type. However, this last one exhibited a small peak at 5.5° at 2 θ , which is typical of B-type patterns (Figure 2 b). Therefore, this starch was classified as a CA-type due to the greater similarity of the peaks to A-type. Hoover (2001) and Moorthy (2002) also reported a CA-type pattern in cassava starch. It was expected that Peruvian carrot starch displayed a C-type X-ray diffraction pattern due to the large amount of both short and long chains observed in this starch (Table 1). However, this starch displayed a typical B-type pattern, and proved to be an exception.

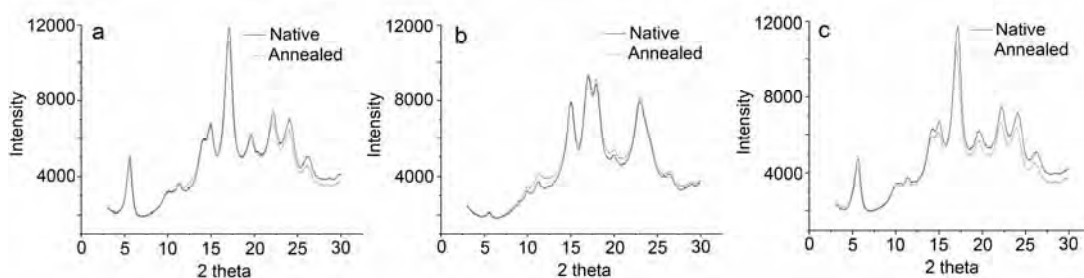


Figure 2. X-ray patterns of starches before and after annealing: (a) Peruvian carrot, (b) cassava, and (c) potato.

None of the X-ray diffraction patterns of the starches were influenced by the annealing, and remained unchanged. These results agree with those of Liu et al. (2009) and

Hoover and Vasanthan (1994), who also subjected different starches to the different annealing conditions.

The relative crystallinity of the three starches was similar and close to 37% (Table 2). After annealing, the crystallinity in Peruvian carrot and potato starches increased, whereas it did not change in cassava starch. Lan et al. (2008) found increased crystallinity in annealed normal, waxy, and high amylose bread wheat starches, whereas Jacobs et al. (1998) found no significant changes in crystal type and degree of crystallinity of annealed wheat, potato and pea starches. Because annealing is a treatment that causes a rearrangement of starch molecules leading to an increase in crystal perfection, or an increase in crystallite size (Genkina et al., 2004; Tester et al., 1998) or in formation of new crystallites (Chung et al., 2009; Hoover & Vasanthan, 1994), the higher crystallinity found in Peruvian carrot and potato starches may be attributed to the more well-organized crystalline structure of these starches acquired after the hydrothermal treatment, in function of the higher amount of chains of DP >37 displayed in these starches, which would have a structure that is more susceptible to reorganization than that of cassava starch.

3.3 – Amylose content

Peruvian carrot starch showed 20.0% of apparent amylose content (Table 2), which is a value close to those obtained by Rocha et al. (2008) and Vieira and Sarmiento (2008), whose values were based on iodine affinity of whole starch. However, the iodine affinity of amylopectin isolated from this starch was high (2.40). This indicated that the large proportion of long branched chains of amylopectin (DP >37) found in this starch (Table 1) contributed to its increased amylose content by forming a complex with iodine. The absolute amylose content of this starch was only 9.1%, which is a value close to that found by Santacruz et al. (2002), who used size exclusion chromatography. As observed in Peruvian carrot starch, potato starch also showed a great difference between apparent and absolute amylose contents due to the large proportion of long branched chains found in this starch.

To verify if the gelatinization of the starches occurred during annealing, the apparent amylose content of the annealed starches and the leached amylose were determined (Table 2). After annealing, the apparent amylose content did not change in any starches. The amount of amylose leached to supernatant during annealing varied from 0.2% to 0.5%. Tester et al. (1998) reported similar values of amylose leached during annealing of wheat starch at 35 °C

and 45 °C. The loss of amorphous material during the hydrothermal treatment can be considered insignificant, since there was no change in apparent amylose content of the starches. These results indicate that the gelatinization of the starch granules did not occur under the annealing conditions used.

Table 2. Percentage of crystallinity and amylose content of starches before and after annealing.

Starches	Percentage of crystallinity (%)		Amylose content (%)			
	Before annealing	After annealing	Apparent ¹	Absolute ²	Apparent ¹ after annealing	Leached ³
Peruvian carrot	37.1 ^{cd}	43.1 ^a	20.0 ^c	9.1 ^f	20.3 ^c	0.18 ^B
Cassava	36.2 ^d	37.0 ^{cd}	23.2 ^b	17.0 ^e	23.4 ^b	0.50 ^A
Potato	38.3 ^c	41.1 ^b	30.4 ^a	18.4 ^d	30.3 ^a	0.19 ^B

^a Values with the same lower case letter are not significantly different at $p < 0.05$, for each analysis; ^A Values with the same capital letter are not significantly different at $p < 0.05$; ¹ Calculated as: $C = 100 \times IAS / 0.20$ where C is the percentage of apparent amylose content and IAS is the iodine affinity of the whole defatted starch; ² Calculated as: $C = (IAS - IAP+IC) / [0.20 - (IAP+IC / 100)]$ where C is the percentage of absolute amylose content, IAS is the iodine affinity of whole defatted starch, and IAP+IC is the iodine affinity of the amylopectin and the intermediate component mixture; ³ Amylose leached to supernatant during annealing.

3.5 – Morphology and internal structure

Granular size and shape are related to the botanical source of the starches. Peruvian carrot starch showed round and irregular shaped granules. Fragile granules, which tended to separate into pieces, were also found (Figure 3-1a ↓). Cassava starch showed round shaped granules with some convex edges (Figure 3-1b), whereas potato starch predominantly showed oval shaped granules (Figure 3-1c). The surface of Peruvian carrot starch granules displayed some depressions, whereas smooth surfaces were found in cassava and potato starches.

After annealing, the granular shape of the starches remained unchanged. The granular surface of Peruvian carrot and potato starches were not altered after treatment. However, in cassava starch, the presence of some fissures was observed (Figure 3-1e ↓). Serrano and Franco (2005) also observed some fissures on cassava starch granule surfaces after annealing.

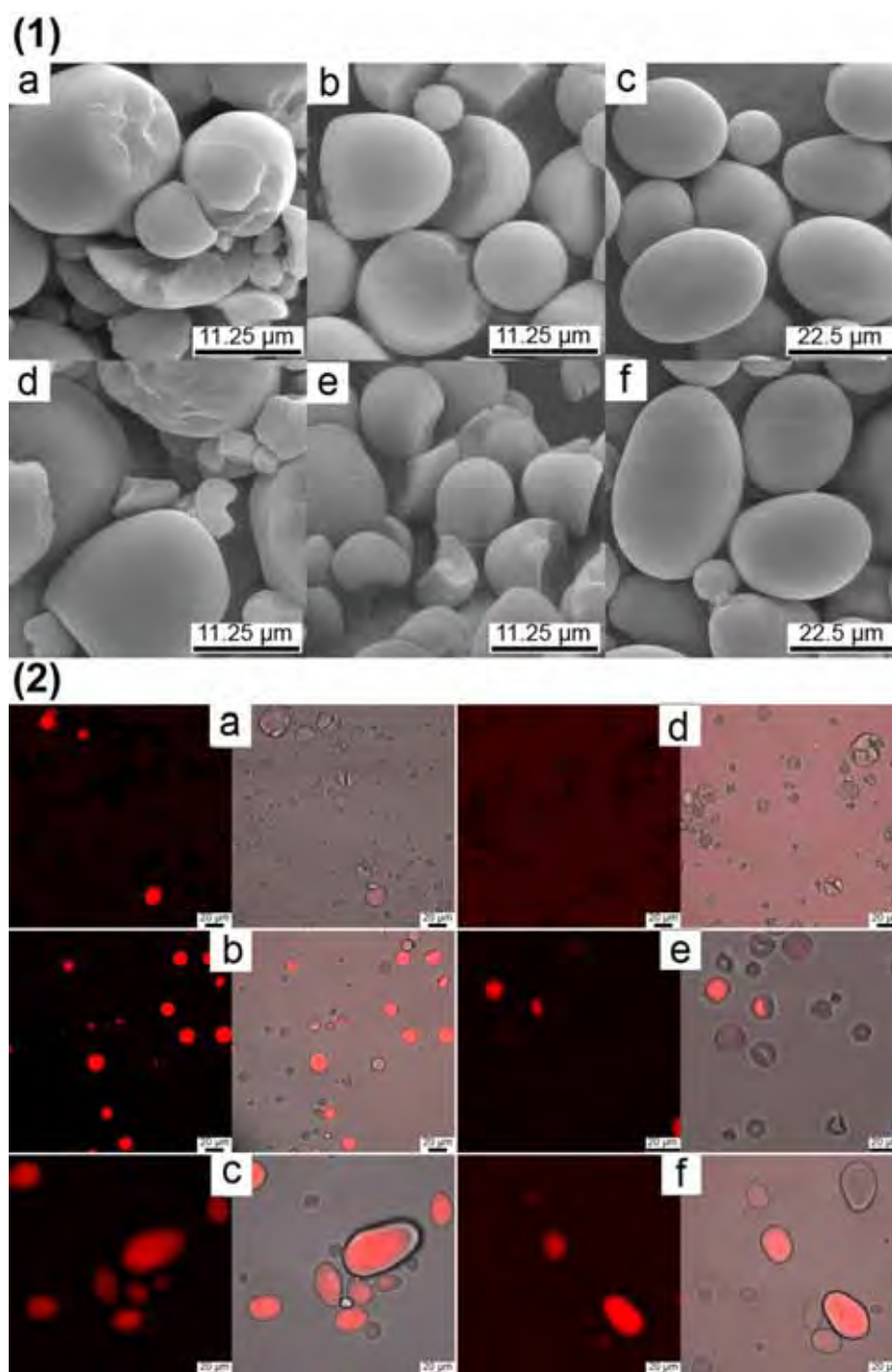


Figure 3. Micrographs of starches: (1) Scanning electron micrographs, (2) confocal laser scattering micrographs (left) and overlaid optical and confocal laser scattering micrographs (right). Native starches: Peruvian carrot (a), cassava (b), and potato (c). Annealed starches: Peruvian carrot (d), cassava (e) and, potato (f).

Peruvian carrot starch granules could not be well visualized using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (Figure 3-2a). Only a few large granules were stained with rhodamine B, and these did not show voids or cavities. According to Han and Hamaker, (2002), rhodamine B, which was used in this study, stains starch granules by labeling starch granule-associated proteins. These proteins, present in minute amounts in starch granules, are mainly granule-bound starch synthase (GBSS), which is responsible for amylose production. Then, it is possible that Peruvian carrot starch has a very low concentration of GBSS, which could also explain the low absolute amylose content (9.1%) found in this starch (Table 2).

Fragile and brittle granules of Peruvian carrot starch were also found in the overlaid optical and confocal laser scattering micrograph (Figure 3-2a), resulted from the crystalline structure defects of this starch, which could lead to formation of less stable crystallites that can disrupt easily. Similar observations were made by Jane et al. (2004) in the case of sugary-2 maize starch. The overlaid optical and confocal laser scattering micrographs also revealed that none of the small-diameter granules of all starches stained with rhodamine B. Cassava starch granules stained with rhodamine B showed an internal structure with no voids or cavities (Figure 3-2b). Potato starch showed granules with pronounced internal layers, which represent the growth rings (Figure 3-2c). Internal structures of both cassava and potato starches agree with the findings from Velde et al. (2002).

After annealing, the capacity to retain the dye decreased for all starches. The crystalline structure reorganization caused by the hydrothermal treatment made the diffusion of the dye into the granule difficult; thus, the visualization of the internal structure was compromised. None of the Peruvian carrot starch granules were observed (Figure 3-2d). Only a few granules of cassava (Figure 3-2e) and potato (Figure 3-2f) starches were visualized, and these displayed compact structures, with no voids, cavities or internal layers.

3.6 – Thermal properties

Peruvian carrot starch showed the lowest onset gelatinization temperature (T_0), followed by cassava starch (Table 3). Starches with a large proportion of short chains have lower gelatinization temperatures (Jane et al., 1999; Jane & Chen, 1992). These starches also presented a shoulder on the amylopectin branched-chain length distribution at DP 18-24, which are considered crystalline structural defects and contribute to the starch's low gelatinization temperatures (Genkina et al., 2007; Jane et al., 1999). On the other hand, the

larger amount of long branched chains (DP >37) of amylopectin displayed in Peruvian carrot and potato starches contributed to their higher enthalpy changes (ΔH).

Increased gelatinization temperatures of all starches and a decreased range of gelatinization temperatures were found as a result of annealing. However, the ΔH increased only in Peruvian carrot and potato starches, and remained unchanged in cassava starch (Table 3). A higher gelatinization temperature accompanied with a narrowing of the gelatinization temperature range occurs in all native starches after annealing, whatever their polymorphic structure or amylose content (Genkina et al., 2007, Tester et al., 2000; Tester et al., 1998), because the hydrothermal treatment causes a crystalline structure reorganization of the granules enhancing interaction between starch molecules.

The enthalpy change (ΔH) is mainly related to the loss of order in the double helices (Hoover, 2001). Thus, the increase in the ΔH of Peruvian carrot and potato starches may be attributed to a greater resistance of double helices from crystalline regions to melt acquired after annealing, which also caused the increase in the crystallinity of these starches (Table 2).

Table 3. Thermal properties of starches, before and after annealing.

Starches	T_o^* (°C)	T_p^* (°C)	T_c^* (°C)	ΔT^* (°C)	ΔH^* (J/g)
Before annealing					
Peruvian carrot	56.99 ^e	60.29 ^d	64.42 ^e	7.43	16.8 ^b
Cassava	59.10 ^d	67.28 ^b	74.63 ^a	15.53	13.6 ^d
Potato	62.04 ^c	64.75 ^c	68.59 ^c	6.55	15.5 ^c
After annealing					
Peruvian carrot	61.85 ^c	64.45 ^c	67.40 ^d	5.55	17.8 ^a
Cassava	65.30 ^b	69.28 ^a	74.25 ^a	8.95	13.9 ^d
Potato	67.71 ^a	69.93 ^a	72.91 ^b	5.20	17.9 ^a

^a Values with the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$; T_o = onset temperature, T_p = peak temperature, T_c = conclusion temperature, $\Delta T = T_c - T_o$, ΔH = enthalpy change.

3.7 – Enzymatic hydrolysis

In native and annealed starches, with the exception of potato starch, the hydrolysis percentage increased progressively for approximately 72 h, at which point the hydrolysis rate decreased and remained practically constant for the remaining 48 h of incubation (Figure 4).

After 120 h of reaction, Peruvian carrot starch had 53% of hydrolysis, a value that was similar to the one observed in cassava starch (56%). Potato starch was the most resistant and

displayed only 10% of hydrolysis. It is widely known that B-type starches are more resistant to enzymatic hydrolysis due to the large proportion of very long branched chains of amylopectin (DP >37), which extend through two or more clusters and stabilize the internal structure of granules; whereas in A-type starches, the large proportion of short chains of DP 6-12 promotes the formation of short double helices, which result in a less stable crystalline structure that is more susceptible to enzymatic attack (Jane, 2006; Tester et al., 2006). However, Peruvian carrot starch showed a profile of hydrolysis similar to that of the cassava starch. This may be because Peruvian carrot starch also consists of a large proportion of short branched chains of amylopectin, making it more susceptible to enzyme action. Additionally, the granule surface area for enzyme adsorption must be considered during enzymatic hydrolysis (Li et al., 2004; Lindeboom et al., 2004). Peruvian carrot starch granules have an average diameter of 15 μm (Rocha et al., 2008), whereas potato starch granules have an average diameter of 40 μm (Buléon et al., 1998). Small granules have a higher surface area per unit of weight than large granules, which, when combined with the other factors already cited, may have contributed to the greater susceptibility of Peruvian carrot starch to enzymes.

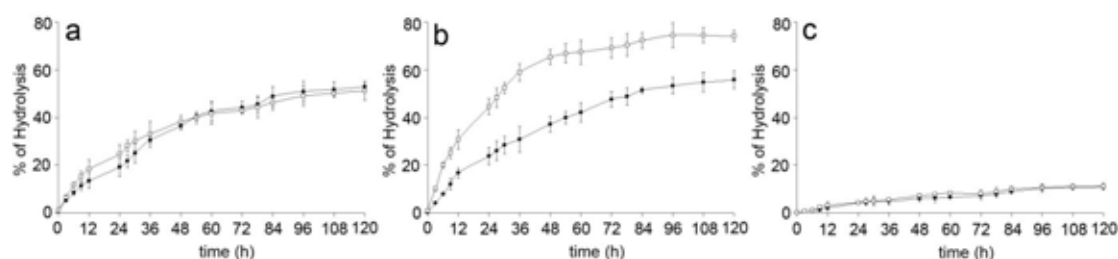


Figure 4. Enzymatic hydrolysis of starches before (●) and after (□) annealing. Peruvian carrot (a), cassava (b), and potato (c).

After annealing, Peruvian carrot starch became slightly more susceptible to enzymatic hydrolysis in the first 48 h of incubation, at which point it maintained a profile that was similar to the native starch. However, cassava starch became much more vulnerable to enzyme action, whereas no difference was visualized in potato starch.

Because annealing is a treatment that causes a rearrangement of starch molecules crystalline structure reorganization leading to more perfect crystallites, the expected result was that modified starches would show a greater resistance to enzymatic hydrolysis. However, the greater susceptibility of Peruvian carrot annealed starch in the first 48 h of hydrolysis suggests that, for this starch, the amorphous regions became more accessible to

enzymes after annealing. For cassava annealed starch, the appearance of fissures on the granule surface (Figure 3-1), which allowed for degradation caused by endocorrosion, seems to be the main factor for the greater increase in the rate of hydrolysis. Higher enzymatic susceptibility was also found for sago (Wang et al., 1997), and cassava (Serrano and Franco, 2005) annealed starches in relation to the native starch, due to fissures on the granules surface. Finally, potato starch, which was the most resistant before annealing, still showed the same resistance after treatment.

3.8 – Amylose content of the enzymatic hydrolysis residues

The apparent amylose content of native and annealed starches, obtained at 12 h, 36 h, and 96 h of enzymatic hydrolysis, were evaluated (Table 4). Before annealing, the amylose molecules of Peruvian carrot and cassava starches showed progressive degradation over time of hydrolysis. The apparent amylose content of Peruvian carrot starch decreased from 20% at 0 h to 14.1% at 96 h of hydrolysis. The native cassava starch initially had 23.2% of apparent amylose, and at 96 h of hydrolysis, it had 21.6%. These results show that the amylose molecules of the Peruvian carrot starch were more available to enzymatic attack than those of cassava starch.

After the hydrothermal treatment, the amylose degradation of Peruvian carrot starch was most intense at first 12 h of hydrolysis, decreasing from 20.3 to 13.5% at this point and remaining constant after that. In annealed cassava starch, the apparent amylose content gradually reduced over time of hydrolysis; however, the amylose molecules were attacked more after annealing when compared to the native starch. At 96 h of hydrolysis, the apparent amylose content of this starch was only 16.5%. No difference was observed in the apparent amylose content of native and annealed potato starches during the enzymatic hydrolysis, probably due to the low hydrolysis rate of this starch.

The location of amylose and amylopectin within the starch granules is still not completely understood. However, these results suggest that, in native Peruvian carrot and cassava starches, the amylose molecules were dispersed and inter-bound to amylopectin molecules, and somehow protected from the enzymatic attack on the semi-crystalline structure. After annealing, the structural rearrangement provoked by the increase of mobility of the molecules in water during the treatment may have decreased the interaction between amylose and amylopectin and thus promoted a higher exposure of amylose molecules of these

starches to the enzyme action.

Table 4. Amylose content and average amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues, before and after annealing.

Starches	Amylose content (%)							
	Before annealing				After annealing			
	0h	12h	36h	96h	0h	12h	36h	96h
Peruvian carrot	20.0 ^a	17.6 ^b	15.9 ^c	14.1 ^d	20.3 ^a	13.5 ^d	14.1 ^d	14.1 ^d
Cassava	23.2 ^a	23.2 ^a	22.0 ^b	21.6 ^{bc}	23.4 ^a	20.3 ^c	19.4 ^c	16.5 ^d
Potato	30.4 ^a	30.8 ^a	29.3 ^b	30.1 ^a	30.3 ^a	30.1 ^a	29.9 ^{ab}	30.3 ^a
	Average amylopectin molar mass ($M_w \times 10^8$ (g/mol))							
	Before annealing				After annealing			
	0h	12h	36h	96h	0h	12h	36h	96h
Peruvian carrot	2.2 ^{ab}	2.4 ^a	1.9 ^b	1.5 ^c	2.4 ^a	1.9 ^b	1.9 ^b	1.8 ^b
Cassava	5.1 ^a	5.1 ^a	4.6 ^b	5.1 ^a	5.0 ^a	5.0 ^a	4.5 ^b	5.1 ^a
Potato	1.5 ^a	1.5 ^a	1.2 ^{ab}	0.9 ^b	1.3 ^{ab}	1.2 ^{ab}	1.0 ^b	1.2 ^{ab}

^a Values with the same letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$.

No difference was observed in the apparent amylose content of potato starch before and after annealing during the enzymatic hydrolysis, probably due to the low hydrolysis rate of this starch.

The location of amylose and amylopectin within the starch granules is still not completely understood. However, these results suggest that for native Peruvian carrot and cassava starches, the amylose molecules were dispersed and inter-bounded to amylopectin molecules, and somehow protected from the enzymatic attack at the semi-crystalline structure. After annealing, the structural rearrange provoked by the increase of mobility of the molecules in water during the treatment, may have decreased the interaction between amylose and amylopectin, and thus, promoted a higher exposition of amylose molecules of these starches to the enzymes action.

3.9 – Average amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues

The weight-average molar mass (M_w) of amylopectin of the native and annealed starches subjected to enzymatic hydrolysis is shown in Table 4. The amylopectins of Peruvian carrot and potato starches showed an M_w that was smaller than that of cassava starch. The

highest gyration radius (R_z) was observed in cassava starch, which also showed the largest ρ (data not shown). These results are consistent with previous studies, which reported a higher M_w and ρ for amylopectins of A-type starches than that of B-type starches (Yoo & Jane, 2002; Yoo et al., 2009).

The amylopectin M_w of Peruvian carrot and potato starches before annealing decreased over time of enzymatic hydrolysis. In cassava starch, the M_w decreased at 36 h of hydrolysis, but at 96 h a M_w similar to that at 0 h was observed. This result suggests that, at 36 h of hydrolysis of cassava starch, there was a higher amount of degraded amylopectin than at 96 h of hydrolysis. It is possible that the enzymatic attack on amylopectin of this starch was concentrated in some molecules until they were mostly degraded. Thus, the quantity of intact amylopectin molecules at 96 h of hydrolysis may be higher than at 36 h of hydrolysis in the same sample amount.

Peruvian carrot and potato starches had a crystalline structure that was more prone to reorganization, which allowed for an increase of the percentage of crystallinity with annealing (Table 2). It is possible that, before annealing, the enzymes had greater access to amylopectin chains of these starches, allowing for the hydrolysis. However, in potato starch, the degradation of amylopectin molecules did not influence the apparent amylose content of this starch, which remained unchanged due to its low rate of hydrolysis.

After annealing, the amylopectin M_w of Peruvian carrot starch decreased at 12 h of hydrolysis, and remained constant thereafter. However, after 96 h of incubation, the amylopectin M_w of this annealed starch was higher than that of the native starch at the same point in the hydrolysis process. In cassava starch, the enzymatic attack on the amylopectin molecules was similar to that in the starch before annealing. The amylopectin M_w of annealed potato starch did not reduce during or after enzymatic hydrolysis. These results showed that amylopectin molecules of Peruvian carrot and potato starches became more resistant to the action of the enzymes as a result of the hydrothermal treatment. However, the higher reduction in the apparent amylose content found in the annealed Peruvian carrot starch after the first 12 h of the hydrolysis may be due to the degradation of amylose molecules and also to the degradation of very long branched chains of amylopectin.

Hoover and Vasanathan (1994) and Jacobs et al. (1998) state that mobility of the amylose chains increases during annealing, resulting in double helix formation due to the interaction of amylose/amylose and/or amylose/amylopectin chains. However the findings herein showed an increase on the percentage of crystallinity of Peruvian carrot starch after

annealing (Table 2), in addition to a greater resistance of amylopectin molecules, as well as a greater susceptibility of amylose molecules to the enzymatic action. This suggests increased interaction between amylopectin/amylopectin chains and decreased interaction between amylose/amylopectin chains of this starch, which causes an increase in the susceptibility of amylose chains to the enzymes. However, a greater exposure of long branched chains of amylopectin to the action of the enzymes may have also occurred. The annealing also caused more exposure of amylose molecules of cassava starch to enzymatic hydrolysis, but no significant effect on amylopectin susceptibility was observed. Despite the low rate of hydrolysis of the potato starch, this starch's amylopectin molecules still showed a greater resistance to the action of enzymes after annealing.

4 – CONCLUSION

Peruvian carrot starch had structural characteristics that differed from cassava and potato starches. It is a B-type starch that consists of a large amount of both short and very long branched chains of amylopectin. This starch showed fragile granules that are likely formed due to a weak crystalline structure. It also had a lower amylose content, a lower gelatinization temperature, and a higher enthalpy change when these values were compared to those of cassava and potato starches. Amylose molecules from the Peruvian carrot may be interspersed among the amylopectin molecules. Annealing promoted the formation of new interactions between amylopectin chains, which enhanced the crystallinity of this starch and protected them from enzymatic attack. These new interactions may have exposed the amylose chains, which became more susceptible to hydrolysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, for financial support.

REFERENCES

Biliaderis, C. G. (2009). Structural transitions and related physical properties of starch. In J. BeMiller & R. Whistler. *Starch: chemistry and Technology* (pp. 293-372). Burlington:

Academic Press.

Bul  n, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.

Chung, H. J., Liu, Q., & Hoover, R. (2009). Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and lentil starches. *Carbohydrate Polymers*, 75, 436-447.

Defloor, I., Dehing, I., & Delcour, J. A. (1998). Physico-chemical properties of cassava starch. *Starch*, 50, 58-64

Franco, C. M. L., & Ciacco, C. F. (1992). Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules: effect of size of the granules. *Starch*, 44, 422-426.

Franco, C. M. L., Wong, K. S., Yoo, S., & Jane, J. (2002). Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. *Cereal Chemistry*, 79, 243-248.

Genkina, N. K., Wasserman, L. A., Noda, T., Tester, R. F., Yuryev, V. P. (2004). Effects of annealing on the polymorphic structure of starches from sweet potatoes (Ayamurasaki and Sunnyred cultivars) grown at various soil temperatures. *Carbohydrate Research*, 339, 1093-1098.

Genkina, N. K., Wikman, J., Bertoft, E., & Yuryev, P. (2007). Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. *Biomacromolecules*, 8, 2329-2335.

Han, X. Z., & Hamaker, B. R. (2002). Location of starch granule-associated proteins revealed by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cereal Science*, 35, 109-116.

Hizukuri, S., Kaneko, T., & Takeda, Y. (1983). Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 760, 188-191.

Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 45, 253-267.

Hoover, R., & Vasanthan, T. (1994). The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 303-325.

Jacobs, H., & Delcour, J. A. (1998). Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2895-2904.

Jacobs, H., Eerlingen, R. C., Rouseu, N., Colonna, P., & Delcour, J. A. (1998). Acid

hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. *Carbohydrate Research*, 308, 359-371.

Jane, J. (2006). Current understanding on starch granule structure. *Journal of Applied Glycoscience*, 53, 205-213.

Jane, J. L., & Chen, J. F. (1992). Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. *Cereal Chemistry*, 69, 60-65.

Jane, J., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., & Robyt, J. F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron-microscopy. *Starch*, 46, 121-129.

Jane, J., Atichokudomchai, N., Suh, D. S. (2004). Internal structures of starch granules revealed by confocal laser-light scanning microscopy. In P. Tomasik, V. P. Yuryev, & E. Bertof. *Starch: progress in structural studies, modifications and applications* (pp. 147-156). Kraków: Polish Society of Food Technologists.

Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M., & Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry*, 76, 629-637.

Kasemsuwan, T., Jane, J., Schnable, P., Stinard, P., & Robertson, D. (1995). Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Ae1-5180) maize starch. *Cereal Chemistry*, 72, 457-464.

Kiseleva, V. I., Krivandin, A. V., Fornal, J., Blaszcak, W., Jelinski, T., & Yuryev, V. P. (2005). Annealing of normal and mutant wheat starches. LM, SEM, DSC, and SAXS studies. *Carbohydrate Research*, 340, 75-83.

Lan, H., Hoover, R., Jayakody, L., Liu, Q., Baga, M., Asare, E. K., Hucl, P., & Chibbar, R. N. (2008). Impact of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of normal, waxy and high amylose hard wheat starches. *Food Chemistry*, 111, 663-675.

Li, J. H., Vasanathan, T., Hoover, R., & Rossnagel, B. G. (2004). Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chemistry*, 84, 621-632.

Liu, H., Yu, L., Simon, G., Dean, K., & Chen, L. (2009). Effects of annealing on gelatinization and microstructures of corn starches with different amylose/amylopectin ratios. *Carbohydrate Polymers*, 77, 662-669.

Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch*, 56, 89-99.

- Moorthy, S. N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. *Starch*, 54, 559-592.
- Morrel, M. K., Samuel, M. S., & O'shea, M. G. (1998). Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, 2603-2611.
- Nara, S., & Komiya, T. (1983). Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. *Starch*, 35, 407-410.
- Noda, T., Tsuda, S., Mori, M., Takigawa, S., Endo, C. M., Saito, K., Mangalika, W. H. A., Hanaoka, A., Susuki, Y., & Yamauchi, H. (2004). The effect of harvest date on the starch properties of various potato cultivars. *Food Chemistry*, 86, 119-125.
- Palav, T., & Seetharaman, K. (2006). Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. *Carbohydrate Polymers*, 65, 364-370.
- Peroni, F. H. G., Rocha, T. S., & Franco, C. M. L. (2006). Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. *Food Science and Technology International*, 12, 505-513.
- Rocha, T. S., Demiate, I. M., & Franco, C. M. L. (2008). Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 620-628.
- Santacruz, S., Koch, K., Svensson, E., Ruales, J., & Eliasson, A. C. (2002). Three underutilized sources of starches from the Andean region in Ecuador. Part 1. Physicochemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, 49, 63-70.
- Serrano, P. O., & Franco, C. M. L. (2005). Modificação hidrotérmica ("annealing") e hidrólise enzimática do amido de mandioca. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8, 220-232.
- Somogyi, M. (1945). New reagent for the determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, 160, 61-68.
- Tester, R. F., Debon, S. J. J., & Karkalas, J. (1998). Annealing of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 28, 259-272.
- Tester, R. F., Debon, S. J. J., & Sommerville, M. D. (2000). Annealing of maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 42, 287-299.
- Tester, R. F., Qi, X., Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 39-54.
- Velde, F., Riel, J., & Tromp, R. H. (2002). Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy (CLSM). *Journal of the Science of Food and Agriculture*,

82, 1528-1536.

Vieira, F. C., & Sarmento, S. B. S. (2008). Heat-moisture treatment and enzymatic digestibility of Peruvian carrot, sweet potato and ginger starches. *Starch*, 60, 223-232.

Wang, W. J., Powell, A. D., & Oates, C. G. (1997). Effect of annealing on the hydrolysis of sago starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 33, 195-202.

Yoo, S. H., & Jane, J. (2002). Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydrate Polymers*, 49, 307-314.

Yoo, S. H., Perera, C., Shen, J., Ye, L., Suh, D. S., & Jane, J. (2009). Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1556-1564.

Capítulo 4

Effect of annealing on the semi-crystalline structure of normal and waxy corn starches

Thais S. Rocha¹, Suélen G. Felizardo¹, Jay-lin Jane², Célia M. L. Franco¹

¹ Department of Food Technology and Engineering UNESP – São Paulo State University, Rua Cristóvão Colombo, 2265; CEP: 15054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Department of Food Science and Human Nutrition, 2312 Food Science Building, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA.

ABSTRACT

The influence of amylose and amylopectin on structural reorganization during annealing was studied for normal and waxy corn starches. The gelatinization temperatures increased for both starches after annealing, but ΔH increased only for waxy corn starch. The percentage of crystallinity also increased only for waxy corn starch. Significant increase in number of pores on the surface of some granules was observed, especially for normal corn starch after annealing. Amylose and amylopectin of annealed normal corn starch were degraded to great extent during enzymatic hydrolysis than that of the native starch. For waxy corn starch the annealing caused a protective effect on the amylopectin toward the enzyme reaction action. These results suggest that annealing promoted a better interaction of amylopectin chains of waxy corn starch. The amylose molecules of normal corn starch may have impaired the mobility of amylopectin molecules restrict re-organization of crystalline structure during the annealing. The major increase in pore number on the granule surface of the annealed normal corn starch could facilitate the degradation of its amorphous area by the enzymes.

Keywords: amylopectin; amylose; annealing; morphology; structural characteristics.

INTRODUCTION

Starch is mainly composed of two biopolymers, a basically linear amylose and a highly branched amylopectin and is present in semi-crystalline granules. During their biosynthesis some defects in the order of starch structure are developed, such as: suboptimization of the amylopectin double helices in the crystallites [1]; double helices located in the crystalline lamellae but not being part of the crystallites [2], alignment in disarray of the amylopectin double helices within the crystalline lamellae [3] and presence of disorganized amylose chains in the amorphous area [1].

Annealing is a hydrothermal treatment that can remove or minimize some defects of the starch granules [4]. This treatment promotes a structural reorganization of starch granules in water at a temperature above the glass transition and below the gelatinization temperatures [5]. During annealing, molecules in the amorphous region of the granule hydrate and increase the mobility of the amorphous molecules and cause a limited but reversible swelling of the granule. This swelling allows mobility in the crystalline domains with limited side by side movements of the double helices [6]. The annealing results in a more perfect ordered structure and an increase in the granule stability by improving arrangement of double helices and perfection of starch crystallites [7]. The annealing effects are maximized at temperatures high below the onset gelatinization temperature [3] but does not destroy the granular structure [8].

Annealing of corn starches has already been studied by other researchers [9,10] but the effects of amylose and amylopectin molecules during the hydrothermal treatment are not clear. Thus, the objectives of this study were to determine the effects of annealing at sub-gelatinization temperatures on the structural characteristics of normal and waxy corn starches and to investigate the influence of amylose and amylopectin molecules on the mechanism of action of this hydrothermal treatment.

MATERIALS AND METHODS

Normal corn grains of BR 106 line were provided by EMBRAPA (Sete Lagoas, Brazil) and waxy corn grains of a hybrid WxA504 were produced by Dow AgroSciences and provided by Corn Products of Brazil (São Paulo, Brazil). The enzymes amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (Sigma Chemical Co., USA), α -amylase from *Bacillus* sp. (Sigma Chemical Co., USA) and isoamylase from *Pseudomonas* sp. (Megazyme International,

Wicklow, Ireland) were used without further processing. All other chemicals used were analytical grades.

Isolation of starches. Normal and waxy corn starches were isolated by wet milling as described by Eckhoff et al. [11], with some modifications at the steeping procedure. Corn grains (1.0 kg) were steeped at 43 °C for 36h with circulation of steeping water (300 mL/min) containing 0.1% (w/v) of sodium metabisulphite and 0.55% (w/v) of lactic acid.

Annealing. Starch samples were subjected to one-step annealing following the procedure of Jacobs et al. [5], with modifications. Native starch samples, in triplicate, were suspended in distilled water (5% w/v) and incubated in a thermostatically controlled water bath for 24h at a temperature of approximately 3 °C below the onset gelatinization temperature of each starch (63 °C and 62 °C for normal and waxy corn starches, respectively). After that, the samples were vacuum filtered and air oven dried overnight at 38 °C.

Amylose content and leached amylose. Amylose and amylopectin were separated according to Jane and Chen [12]. Iodine affinities of defatted starch samples and of isolated amylopectin were determined by using an automatic potentiometric titrator (702 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland) as described by Franco et al. [13]. The analysis was carried out in triplicate. Amylose leached to the supernatant during annealing was evaluated following procedure of Palav and Seetharaman [14], with some modifications. After annealing, an aliquot of the supernatant (0.05 mL) was treated with 0.25 mL of iodine solution (0.2% KI and 0.02% I₂). The blue color was quantified after 20 min at 630 nm by using an absorbance microplate reader (ELx808, Bio-Tek, Winoosky, USA). Pure amylose (A0512, Sigma Chemical Co., USA) was used to prepare a standard curve. The analysis was done in triplicate.

Amylopectin branch-chain length distribution. Amylopectin was separated from amylose using n-butanol and then debranched using isoamylase as described by Jane and Chen [12]. The debranched chains were labeled with 0.2 M aqueous 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulphonic acid (APTS) and 1 M aqueous sodium cyanoborohydride. The branch-chain length distribution was analyzed using Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis (P/ACE MDQ, Beckman Courter, Fullerton, USA) according to Morrel et al. [15]. The

capillary used was a 50 μm diameter eCAPTM neutral coated with the supplied carbohydrate separation Gel Buffer-N. The sample was introduced by pressure injection at 0.5 psi for 5 seconds. Maltohexaose and maltoheptaose were used as reference standards. The analysis was done in duplicate.

Wide-angle X-ray diffraction (WAXD). Native and annealed starches were equilibrated in desiccator containing saturated BaCl_2 solution (25 $^{\circ}\text{C}$, $a_w = 0.9$) for 10 days, and WAXD patterns were determined using a Wide Angle Goniometer unit (RINT2000, Rigaku, Tokyo, Japan), with copper $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.1542 \text{ nm}$). The scanning speed was $1^{\circ}/\text{min}$ at 50 kV and 100 mA. The percentage of crystallinity was quantitatively estimated based on the relationship between the peak and total areas following method of Nara and Komiya [16] by using the Origin software (version 7.5, Microcal Inc., Northampton, USA). The analysis was done in triplicate.

Amylopectin molar mass and gyration radius. Weight-average molar mass and z-average gyration radius of amylopectin were determined using a High-Performance Size-Exclusion Chromatography – Multi-Angle Laser Light Scattering and Refractive-Index detectors (HPSEC-MALLS-RI). Native and annealed starch samples were prepared as described by Yoo and Jane [17]. The HPSEC system consisted of a isocratic pump (HP 1050 series, Hewlett Packard, Valley Force, USA), a multi-angle laser-light scattering detector (Dawn DSP-F, Wyatt Tech. Co., Santa Barbara, USA) and a refractive index detector (HP 1047A, Hewlett Packard, Valley Force, USA). To separate amylopectin from amylose, a Shodex OH pak KB-guard column and the KB-806 and KB-804 analytical columns (Showa Denko K.K., JM Science, Grand Island, USA) were used. Operating conditions and data analysis were the same as described by Yoo and Jane [17], except that the flow rate used was 0.5 mL/min and the sample concentration was 0.15 mg/mL. The analysis was done in duplicate.

Thermal properties. Gelatinization properties of starch samples were determined by using a differential scanning calorimeter (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, Norwalk, USA) according to Franco et al. [13]. The heating rate used was 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The analysis was done in triplicate.

Scanning electron microscopy. Native and annealed starches, rinsed with ethanol, were mounted on a metal plate covered with a carbon double sided adhesive tape, submitted to a 20 nm gold layer application and observed in a scanning electron microscope (DSM 960, Zeiss, Oberkochen, Germany) operating at an acceleration voltage of 20kV. Images were obtained with magnification of 1,000 and 2,000 times.

Enzymatic Hydrolysis. Native and annealed starches were hydrolyzed with bacterial α -amylase (40 SKB/g of starch) and amyloglucosidase (8 U ^{*}/g of starch) following the method of Franco and Ciacco [18] with modifications. Suspensions of starches (10% w/v) were incubated with the enzymes at 37 °C for 120h. Every 6 hours the concentration of reducing sugar in the supernatant was determined following the method of Somogyi [19]. The enzymatic hydrolysis was stopped following procedure of Vieira and Sarmiento [20] and the residues of the hydrolysis, collected after 12, 36 and 96h, were air dried overnight at 38 °C. The amylose content and the molar mass of amylopectin after hydrolysis were determined as described above.

Statistical analysis. The software Statistics for Windows (v. 5.0, Statsoft, Tulsa, OK) was used to analyze mean values using analysis of variance (ANOVA). Differences were evaluated by *t*-test using Tukey's adjustment. The significance level was set at *p* value < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Amylose content. The most pronounced effects of annealing on the structural characteristics of are obtained at temperatures high below the gelatinization temperature of each starch. To ensure that annealing occurred without any gelatinization of the starches, the amount of amylose leached to supernatant was verified. Normal corn starch had 0.3% and waxy corn starch had 0.1% of amylose or amylopectin, which can complex with iodine, in the supernatant (Table 1). These values are similar to those found by Tester et al. [21] using wheat starch from different varieties subjected to annealing at 35 °C and 45 °C. There was also no change in apparent amylose content of the normal and waxy corn starches after annealing. Normal corn starch consisted of 27.9% of apparent amylose content (Table 1),

* 1 unit (U) is the amount of enzyme that release 1 mg of glucose per g of gelatinized soluble starch incubated at 55°C for 10 min at pH 4.5.

similar to that obtained by Freitas et al. [22], Singh et al. [23] and Jane et al. [24]. Waxy corn starch had only 1.0% of apparent amylose content, as expected. These results suggest that the amount of leached material in the supernatant after annealing is insignificant and gelatinization of the starch granules did not occur during the process of annealing.

Table 1. Apparent amylose content, percentage of crystallinity and average amylopectin molar mass (M_w) and gyration radius (R_z) of starches.

Starches	Apparent amylose content (%)			Percentage of crystallinity (%)		Amylopectin parameters		
	Before annealing	After annealing	Leached ¹	Before annealing	After annealing	$M_w^* \times 10^8$ (g/mol)	R_z^* (nm)	ρ^* (g/mol/n)
Normal corn	27.9 ^a	28.1 ^a	0.3 ^a	32.6 ^c	33.7 ^c	13.2 ^a	383 ^B	23.5
Waxy corn	1.0 ^b	1.0 ^b	0.1 ^b	41.4 ^b	44.3 ^a	11.3 ^b	450 ^A	12.4

^a Values with the same lower case are not significantly different at $p < 0.05$, for each analysis; ^A Values with the same capital letter are not significantly different at $p < 0.05$; ¹ Amylose leached to supernatant after annealing; * M_w = weight-average molar mass, R_z = z-average radius of gyration, ρ = density (M_w/R_z^3).

Amylopectin branch-chain length distribution. The branch-chain length distributions of debranched amylopectins isolated from normal and waxy corn starches are shown in Figure 1. The chain-lengths were divided into four groups (DP 6-12, DP 13-24, DP 25-36 and DP ≥ 37) as classification of Hanashiro et al. [25] and the results are summarized in Table 2.

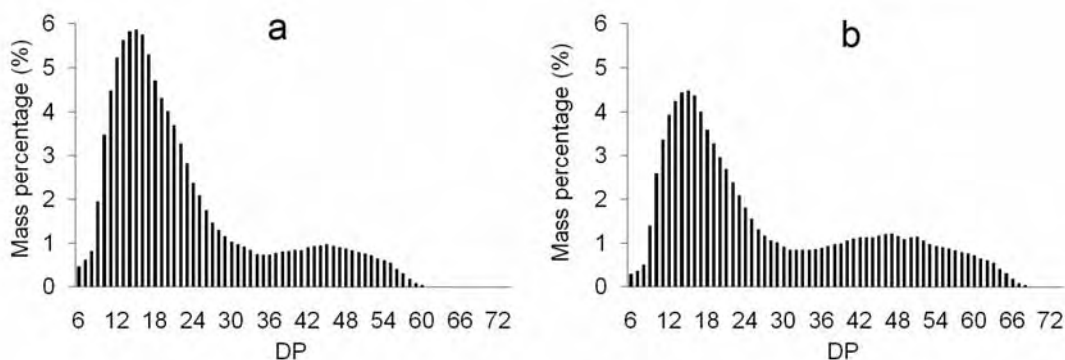


Figure 1. Branch-chain length distribution of amylopectins: (a) normal corn starch, (b) waxy corn starch.

As expected, there were no changes in the profiles of branch-chain length distribution of the amylopectin after annealing for both starches because annealing did not affect the chemical structure of the starch molecules. Normal and waxy corn starches exhibited similar

profiles of branch-chain length distribution of amylopectin. These starches had a marked amount of chains with DP 9 and a peak at DP 15. The amylopectin of waxy corn starch had a larger proportion of chains with $DP \geq 37$ than the amylopectin of normal corn starch, which may have contributed to the larger average DP for the waxy corn starch (Table 2).

Table 2. Branch-chain length distribution of amylopectin of starches in mass-basis, measured by fluophore-assisted capillary electrophoresis.

Starches	Branch chain length distribution (%)				Average DP	Highest detectable DP
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP ≥ 37		
Before Annealing						
Normal corn	17.1 ^a	53.5 ^a	12.8 ^c	16.6 ^b	22.7 ^b	60
Waxy corn	15.5 ^b	50.3 ^b	14.0 ^b	20.2 ^a	24.4 ^a	64
After Annealing						
Normal corn	16.6 ^{ab}	52.6 ^a	13.2 ^{bc}	17.6 ^b	23.4 ^b	64
Waxy corn	16.0 ^{ab}	49.2 ^b	14.4 ^{ab}	20.4 ^a	24.5 ^a	64

^a Values with the same letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

X-ray pattern and crystallinity. The A-type X-ray diffraction pattern of the normal and waxy corn starches was not changed by the annealing. These starches showed the A-type X-ray diffraction pattern (Figure 2), which were in agreement with that previously reported by Saibene and Seetharaman [26], Jane et al. [24] and Hizukuri et al. [27]. Because annealing did not melt double-helical crystalline structure [8] no loss of the X-ray diffraction patterns should be expected. Liu et al. [9] also reported that the X-ray diffraction patterns of corn starches with different amylose/amylopectin ratios did not change after annealing.

The percentage of crystallinity for the waxy corn starch, however, increased. The percentage of crystallinity of the waxy corn starch before annealing was 41.4%, higher than that of the normal corn starch (32.6%) (Table 1). After annealing, the waxy corn starch showed a percentage of crystallinity of 44.3%, an increase of 7.0%. The increase in crystallinity may be attributed to a better organization of double helices and larger crystallites after annealing [10, 28, 29]. It is possible that without amylose, the waxy corn starch has a structure more susceptible to reorganization than the normal corn starch. The amylose present in the normal corn starch granules may have hindered the mobility of the amylopectin molecules during annealing and restricted its structural reorganization. The influence of the amylose on the change in crystallinity of starch after annealing was also observed by Waduge

et al. [30] for barley starches.

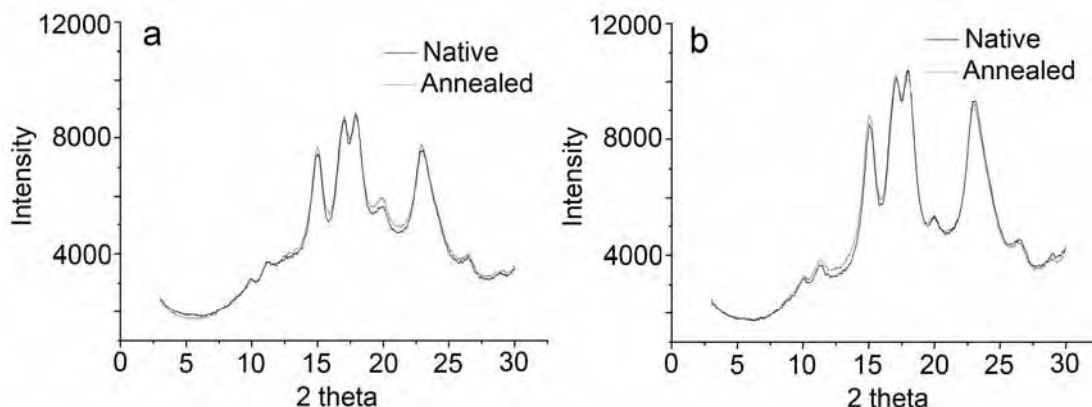


Figure 2. X-ray diffraction patterns of starches before and after annealing: (a) normal corn starch, (b) waxy corn starch.

Amylopectin molar mass, gyration radius and molecular density. The weight-average molar mass (M_w), gyration radius (R_z) and molecular density (ρ) of amylopectins from the normal and waxy corn starches are shown in Table 1. These parameters remained unchanged after the hydrothermal treatment.

The amylopectin of the normal corn starch had a greater M_w than the amylopectin of the waxy corn starch. A larger ρ was also observed for the amylopectin of the normal corn starch, which may be related to its large proportion of short branch-chains (Table 2) [17]. However, the R_z of amylopectin of the waxy corn starch was larger than that observed for the normal corn starch. The larger proportion of long branch-chains of amylopectin of the waxy corn starch (Table 2) may result in the higher R_z , since it is related to the volume occupied by the molecule in solution [31]. These results indicated that the amylopectin molecules of the normal and waxy corn starches were significantly different in their conformation in solution.

Thermal properties. Annealing resulted in an increase in the gelatinization temperature and a smaller range of the gelatinization temperature for both the normal and waxy corn starches. However, the enthalpy change (ΔH) increased only for the waxy corn starch and remained unchanged for the normal corn starch (Table 3). An increase in gelatinization temperature after annealing of the starch was also reported for normal corn starch, for normal, waxy and high amylose wheat starches and for Peruvian carrot cassava and

potato starches [30, 32, 33] This increase in the gelatinization temperatures was expected because the annealing results in a better organized structure of the starch granules [10, 21]. The increase in the gelatinization temperatures and the decrease in the range of gelatinization temperature have been attributed to improvement in the crystalline structure after annealing, mainly due to a better interaction among amylopectins chains [34, 35]. However in this study it is possible that the crystallites improvement of the normal and waxy corn starches was due to a better interaction mainly between the amylopectins chains, since the increase in the onset gelatinization temperature was the same for both normal and waxy starches.

Table 3. Thermal properties of starches, before and after annealing.

Starches	T_o^* (°C)	T_p^* (°C)	T_c^* (°C)	ΔT^* (°C)	ΔH^* (J/g)
Before annealing					
Normal corn	65.7 ^b	69.5 ^c	73.5 ^c	7.8	12.1 ^c
Waxy corn	64.9 ^b	70.7 ^b	76.3 ^b	11.4	13.4 ^b
Amylose-lipid complex					
Normal corn	92.4 ^A	98.2 ^A	102.7 ^A	10.3	0.4 ^A
After annealing					
Normal corn	71.0 ^a	73.5 ^a	75.8 ^b	4.8	12.7 ^{bc}
Waxy corn	70.0 ^a	73.5 ^a	77.6 ^a	7.6	15.4 ^a
Amylose-lipid complex					
Normal corn	91.5 ^A	97.8 ^A	101.7 ^A	10.2	0.4 ^A

^a Values with the same letter lower case in the same column are not significantly different at $p < 0.05$; ^A Values with the same capital letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$; * T_o = onset temperature, T_p = peak temperature, T_c = conclusion temperature, $\Delta T = T_c - T_o$, ΔH = enthalpy change.

The ΔH is the energy for the dissociation of double helices order [36]. Thus, the higher ΔH of the annealed waxy corn starch than the native starch is attributed to an increase in of the double helices order. These results are in agreement with the percentage of crystallinity observed for these two starches after annealing (Table 1). As suggested before, the amylose molecules of normal corn starch might have restricted the mobility of the amylopectin molecules during annealing and did not increase the ΔH .

The amylose-lipid endothermic peak displayed for normal corn starch was not affected by the annealing, agreeing with observations of Tester et al. [21]. It is plausible that the melting temperature of the amylose-lipid complex is high (around 100 °C) and it would not be influenced by the annealing.

Morphology. Scanning electron micrographs of the normal and the waxy corn starch are shown in Figure 3. Some morphological changes could be observed on the starch granules after annealing. The shape of the granules did not alter after the annealing. Both the normal and waxy corn starches showed round and polyhedral shaped granules before and after annealing. However, the surface of some granules of both starches, after annealing, displayed a marked increase in number of pores (Figure 3c and d ↓). It is possible that the formation of a better organized structure allows an increase in the pores on the granule surface.

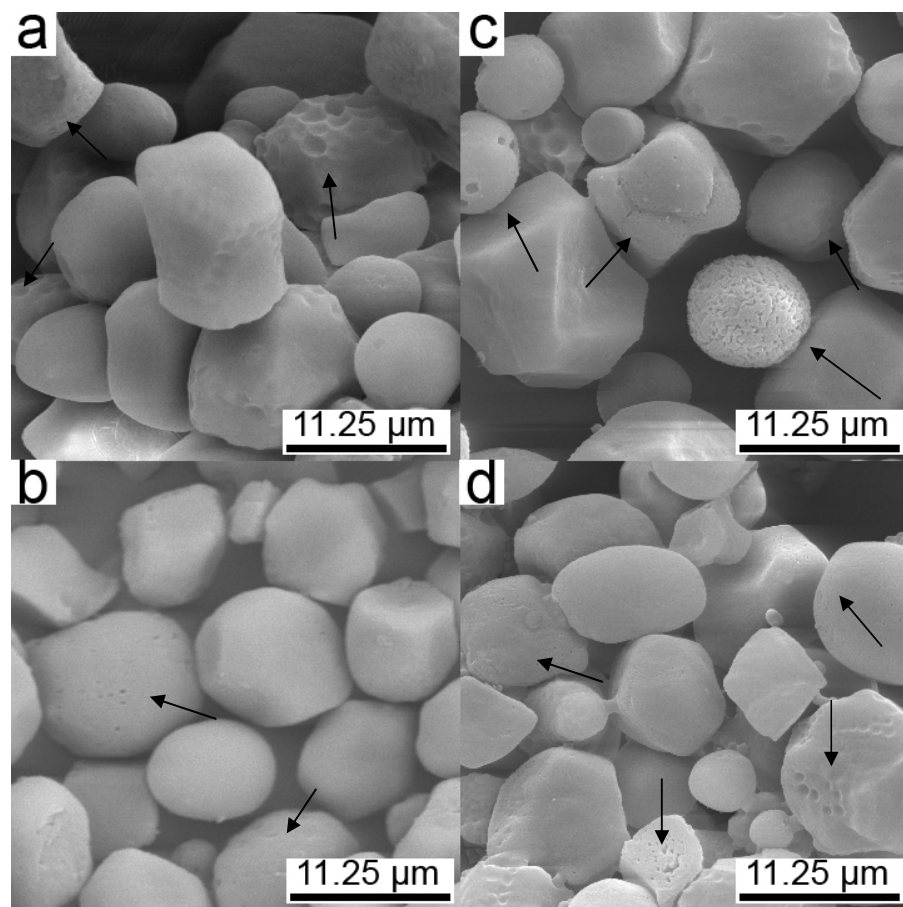


Figure 3. Scanning electron micrographs of starches: (a) native normal corn starch, (b) native waxy corn starch, (c) annealed normal corn starch, (d) annealed waxy corn starch.

The native starches already exhibited pores and depressions on their surface, agreeing with observations of Ferrini et al. [37], Sujka and Jamroz [38] and Jane et al. [39]. However after annealing, beyond the apparent major amount of pores, the pores size increased making

some granules with a rougher surface, mainly for normal corn starch granules. Kiseleva et al. [40] also noted small deformations as puckering on the granule surface of wheat starches more markedly for high-amylose starch than for waxy starch. These results suggest that the amylose molecules of normal corn starch could have influenced on the morphological changes of the granules during annealing.

Enzymatic hydrolysis. Progressive increases in the percentage of hydrolysis were observed for both the normal and waxy corn starches, with or without annealing, until approximately 72h. The hydrolysis rate remained practically constant between 72h and 120h of incubation (Figure 4).

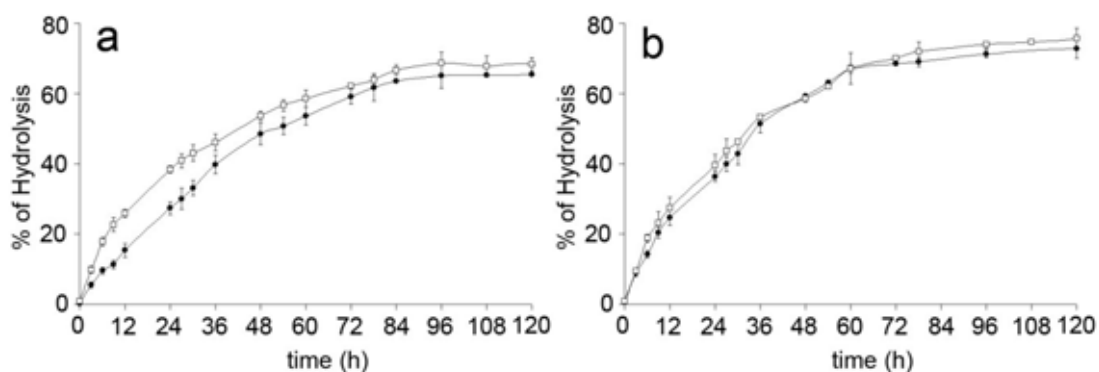


Figure 4. Enzymatic hydrolysis of starches before (●) and after (□) annealing: (a) normal corn starch, (b) waxy corn starch.

The annealed normal corn starch became more susceptible to enzymatic hydrolysis, especially in the first 72h of reaction, whereas the annealed waxy corn starch did not display significant changes in the hydrolysis rate. A decrease in the enzymatic hydrolysis was expected for both annealed starches, because the annealing would generate a better crystalline structure [28, 30]. The annealing opened up the internal structure of starch granules and generate more open space for enzyme to attack. The increase in the enzymatic hydrolysis of normal corn starch suggested that the starch granules became more accessible to the enzyme hydrolysis. The presence of more pores on the surface of some granules after annealing may have contributed to a great exposition of the amorphous areas to the enzymes. Waxy corn starch, as normal corn starch, also displayed more pores on the granule surface after annealing. However, this starch did not show alteration on the enzymatic hydrolysis profile

after annealing probably due to its low amylose content and due to a higher resistance of the better organized crystalline areas, which caused the increase in the percentage of crystallinity (Table 1) and on the ΔH (Table 3).

Apparent amylose content of the enzymatic hydrolysis residues. The native and annealed normal and waxy corn starches obtained after 12, 36, and 96h of enzymatic hydrolysis had the apparent amylose content evaluated (Table 4). The degradation of amylose molecules of both the normal and waxy corn starches, before and after annealing, was progressive with time of hydrolysis. However, the amylose molecules were more attacked by the enzymes after the annealing. For the annealed starches there was an intense degradation of amylose molecules right after 12h of incubation, suggesting that the amorphous areas were more exposed to the action of the enzymes. After 96h of incubation, the apparent amylose content of annealed normal corn starch was much lower than the native starch. For waxy corn starch after 36h of hydrolysis no complex with iodine was observed.

Table 4. Amylose content and amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues, before and after annealing.

Starches	Amylose content (%)							
	Before annealing				After annealing			
	0h	12h	36h	96h	0h	12h	36h	96h
Normal corn	27.9 ^a	27.7 ^a	26.8 ^{ab}	25.5 ^b	28.1 ^a	24.9 ^b	23.4 ^c	19.6 ^d
Waxy corn	1.0 ^a	0.7 ^b	0.0 ^d	0.0 ^d	1.0 ^a	0.4 ^c	0.0 ^d	0.0 ^d
	Average amylopectin molar mass ($M_w \times 10^8$ (g/mol))							
	Before annealing				After annealing			
	0h	12h	36h	96h	0h	12h	36h	96h
Normal corn	13.2 ^a	10.6 ^b	8.8 ^c	6.5 ^d	12.9 ^a	7.5 ^c	5.1 ^e	2.9 ^f
Waxy corn	11.3 ^a	6.8 ^d	5.4 ^e	5.2 ^e	11.5 ^a	11.7 ^a	9.6 ^b	7.7 ^c

^a Values with the same letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$.

During annealing, the rearrange provoked by the mobility of the molecules in water may have decreased the interaction between amylose and amylopectin and promoted a higher exposure of the amylose molecules to the action of the enzymes. The major amount of pores on the surface of some granules after the annealing (Figure 3) could also facilitate the access of the enzymes to the amorphous areas, which resulted in an increase in the susceptibility of

the annealed normal corn starch in the first 72h of enzymatic hydrolysis (Figure 4).

Amylopectin molar mass of the enzymatic hydrolysis residues. The weight-average molar mass (M_w) of amylopectins from enzymatic hydrolyzed normal and waxy corn starches obtained after 12, 36 and 96h, with or without annealing, are shown in Table 4. Both normal and waxy corn native starches showed reduction in the M_w of their amylopectin molecules with time of hydrolysis. However, a different degradation pattern of amylopectin molecules of these two starches was observed after annealing.

The attack of the enzymes on the amylopectin molecules of the normal corn starch was more intense than before the annealing. At 12h of hydrolysis there was a marked decrease in the amylopectin M_w of the normal corn starch after annealing. At the end of 96h of incubation, the M_w was much smaller than the initial value. A greater access to the interior of the granules of this starch due to the major amount of pores observed on the surface of some of its granules after annealing (Figure 3) may have facilitated the degradation of amylopectin molecules as it did the degradation of amylose molecules. Although it had been observed for normal corn starch an increase in the gelatinization temperatures after annealing (Table 3), which shows a better structural organization, the annealing also caused a higher susceptibility of the amylose and amylopectin molecules in the amorphous areas.

The amylopectin molecules of the annealed waxy corn starch, unlike the annealed normal corn starch, were less degraded than the native starch. The improvement in the crystalline structure of the waxy corn starch after annealing consequently caused a greater resistance of the amylopectin molecules to the enzymatic hydrolysis.

In summary, both normal and waxy corn starches had their structural characteristics affected by the annealing. The structural reorganization caused by the annealing, however, was different for these two starches. The annealing resulted in a closely packed amylopectin double helices of waxy corn starch, increasing its percentage of crystallinity, enthalpy change and the resistance of amylopectin molecules to the enzymatic hydrolysis. The amylose molecules of normal corn starch may have impaired the mobility of amylopectin molecules to achieve a better organization of the crystalline structure during annealing. The presence of more pronounced porous on the granule surface of the annealed normal corn starch could have contributed to a greater access of the enzymes during hydrolysis and facilitate the degradation of its amorphous area.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

LITERATURE CITED

- [1] Protserov, V. A.; Wasserman, L. A.; Tester, R. F.; Debon, S. J. J.; Ezernitskaja, M. G.; Yuryev, V. P. Thermodynamic and structural properties of starches extracted from potatoes grown at different environmental temperatures. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *49*, 271-279.
- [2] Kiseleva, V. I.; Genkina, N. K.; Tester, R. F.; Wasserman, L. A.; Popov, A. A.; Yuryev, V. P. Annealing of normal, low and high amylose starches extracted from barley cultivars grown under different environmental conditions. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *56*, 157-168.
- [3] Tester, R. F.; Debon, S. J. J. Annealing of starch – a review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27*, 1-12.
- [4] Qi, X.; Tester, R. F.; Snape, C. E.; Yuryev, V. P.; Wasserman, L. A.; Ansell, R. Molecular basis of the gelatinization and swelling characteristics of waxy barley starches grown in the same location during the same season. Part II. Crystallinity and gelatinization characteristics, *J. Cereal Sci.* **2004**, *39*, 57-66.
- [5] 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. *Carbohydr. Res.* **1998a**, *308*, 359-371.
- [6] Perry, P. A.; Donald, A. M. SANS study of the distribution of water within the starch granules. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *28*, 31-39.
- [7] Jayakody, L.; Hoover, R. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – a review. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 691-703.
- [8] Jacobs, H.; Mischenko, N.; Koch, M. H. J.; Eerlingen, R. C.; Delcour, J. A.; Reynaers, H. Evaluation of the impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato starches: A differential scanning calorimetry and small angle X-ray scattering study. *Carbohydr. Res.* **1998b**, *306*, 1-10.

-
- [9] Liu, H.; Yu, L.; Simon, G.; Dean, K.; Chen, L. Effects of annealing on gelatinization and microstructures of corn starches with different amylose/amylopectin ratios. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 662-669.
- [10] Tester, R. F.; Debon, S. J. J.; Sommerville, M. D. Annealing of maize starch. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 287-299.
- [11] Eckhoff, S. R.; Raush, K. D.; Fox, E. J.; Tso, C. C.; Wu, X.; Pan, Z.; Buriak, P. A laboratory wet milling procedure to increase reproducibility and accuracy of products yields. *Cereal Chem.* **1993**, *70*, 723-727.
- [12] Jane, J. L.; Chen, J. F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch. *Cereal Chem.* **1992**, *69*, 60-65.
- [13] Franco, C. M. L.; Wong, K. S.; Yoo, S.; Jane, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. *Cereal Chem.* **2002**, *79*, 243-248.
- [14] Palav, T.; Seetharaman, K. Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *65*, 364-370.
- [15] Morrel, M. K.; Samuel, M. S.; O'Shea, M. G. Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2603-2611.
- [16] Nara, S.; Komiya, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. *Starch/Stärke* **1983**, *35*, 407-410.
- [17] Yoo, S. H.; Jane, J. Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49*, 307-314.
- [18] Franco, C. M. L.; Ciacco, C. F. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules: effect of size of the granules. *Starch/Stärke* **1992**, *44*, 422-426.
- [19] Somogyi, M. New reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **1945**, *160*, 61-68.
- [20] Vieira, F. C.; Sarmento, S. B. S. Heat-moisture treatment and enzymatic digestibility of Peruvian carrot, sweet potato and ginger starches. *Starch/Stärke* **2008**, *60*, 223-232.
- [21] Tester, R. F.; Debon, S. J. J.; Karkalas, J. Annealing of wheat starch. *J. Cereal Sci.* **1998**, *28*, 259-272.

-
- [22] Freitas, R. A.; Paula, R. C.; Feitosa, J. P. A.; Rocha, S.; Sierakowski, M. R. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Discorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *55*, 3-8.
- [23] Singh, N.; Singh, J.; Kaur, L.; Sodhi, N. S.; Gill, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.* **2003**, *81*, 219-231.
- [24] Jane, J.; Chen, Y. Y.; Lee, L. F.; Mcpherson, A. E.; Wong, K. S.; Radosavljevic, M.; Kasemsuwam, T. Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chem.* **1999**, *76*, 629-637.
- [25] Hanashiro, I.; Abe, J.; Hizukuri, S. A periodic distribution of chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydr. Res.* **1996**, *283*, 151-159.
- [26] Saibene, D.; Seetharam, K. Segmental mobility of polymers in starch granules at low moisture contents. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 539-547.
- [27] Hizukuri, S.; Takeda, Y.; Abe, J.; Hanashiro, I.; Matsunobu, G.; Kiyota, H. Analytical developments: molecular and microstructural characterization. In P. J. Frazier, P. Richmond, & A. M. Donald. *Starch: Structure and Functionality*, (pp. 121-128). London: Royal Society of Chemistry. (1997)
- [28] Lan, H.; Hoover, R.; Jayakody, L.; Liu, Q.; Baga, M.; Asare, E. K.; Hucl, P.; Chibbar, R. N. Impact of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of normal, waxy and high amylose bread wheat starches. *Food Chem.* **2008**, *111*, 663-675.
- [29] 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. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 2045-2051.
- [30] Waduge, R. N.; Hoover, R.; Vasanthan, T. Effect of annealing on the structure and physicochemical properties of barley starches of varying amylose content. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 59-77.
- [31] Millard, M. M.; Dintzis, F. R.; Willett, J. L.; Klavons, J. A. Light-scattering molecular weights, intrinsic viscosities of processed waxy maize starches in 90% Dimethyl Sulfoxide and H₂O. *Cereal Chem.* **1997**, *74*, 687-691.
- [32] Chung, H. J.; Liu, Q.; Hoover, R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and lentil starches. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75*, 436-447.

-
- [33] Rocha, T. S.; Cunha, V. A. G.; Jane, J.; Franco, C. M. L. Structural characterization of Peruvian carrot starch and effect of annealing on its semi-crystalline structure. *Carbohydr. Polym.* **2010**. Submitted.
- [34] Jacobs, H.; Delcour, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2895-2904.
- [35] Hoover, R.; Vasanthan, T. The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. *J. Food Biochem.* 1994, *17*, 303-325.
- [36] Hoover, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 253-267.
- [37] Ferrini, L. M. K.; Rocha, T. S.; Demiate, I. M.; Franco, C. M. L. Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches. *Starch/Stärke* **2008**, *60*, 417-425.
- [38] Sujka, M.; Jamroz, J. Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. *Int. Agrophys.* **2007**, *21*, 107-113.
- [39] Jane, J.; Kasemsuwan, T.; Leas, S.; Zobel, H.; Robyt, J. F. Anthology of starch granule morphology by scanning electron-microscopy. *Starch/Stärke* **1994**, *46*, 121-129.
- [40] Kiseleva, V. I.; Krivandin, A. V.; Fornal, J.; Blaszcak, W.; Jelinski, T.; Yuryev, V. P. Annealing of normal and mutant wheat starches. LM, SEM, DSC, and SAXS studies. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 75-83.

Capítulo 5

Efeito do ‘annealing’ sobre a suscetibilidade enzimática de amidos de raízes e tubérculos

Thaís S. Rocha; Amanda L. C. Hammond; Célia M. L. Franco

UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

RESUMO

Este estudo teve o objetivo de avaliar a influência do ‘annealing’ sobre a suscetibilidade enzimática de amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata. Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ a 3 °C abaixo da temperatura inicial de gelatinização de cada amido foram incubados com as enzimas α -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica a 37 °C por 120h. O amido de mandioquinha-salsa mostrou intensa degradação das cadeias ramificadas da amilopectina durante hidrólise, detectado através de HPAEC-PAD quando comparado aos amidos de mandioca e batata. O padrão de raios-X tipo B deste amido, assim como o do amido de batata, permaneceu inalterado após 96h de hidrólise, mas para o amido de mandioca, o padrão tipo C_A se alterou para A, sugerindo ataque preferencial das enzimas aos cristais tipo B presentes naquele amido. Através de DSC, verificou-se que, com o tratamento enzimático, o ΔH dos amidos diminuiu e as temperaturas de início e de pico aumentaram, sugerindo ação das enzimas nas regiões cristalinas e amorfas dos amidos. O ‘annealing’ provocou um efeito protetor das cadeias ramificadas da amilopectina do amido de mandioquinha-salsa frente à ação enzimática, provavelmente devido à maior interação entre as moléculas de amilopectina ocorrida com o tratamento. No entanto, o tratamento hidrotérmico provocou maior exposição das cadeias da amilopectina com DP 13-24 dos amidos de mandioca e batata.

1. INTRODUÇÃO

O amido é constituído principalmente pelos polímeros de amilose e amilopectina, que estão organizados no grânulo formando uma estrutura semicristalina complexa. As características estruturais de amidos vêm sendo estudadas por muito tempo, no entanto, ainda não existe um consenso sobre a exata localização e organização desses polímeros nos grânulos. Atualmente, acredita-se que haja proximidade entre as cadeias de amilose e amilopectina que estariam possivelmente co-cristalizadas. A amilose estaria mais concentrada na periferia dos grânulos e as amilopectinas na região central teriam maiores comprimentos de cadeias (JANE, 2009).

A maioria dos estudos sobre a estrutura granular dos amidos é realizado com amidos de cereais, como milho, trigo e cevada, ou raízes e tubérculos como mandioca e batata (SANTACRUZ et al., 2002; TESTER; KARKALAS; QI, 2004; JANE, 2006). Poucas e recentes são as pesquisas com amidos de fontes não convencionais como o amido de

mandioquinha-salsa. Este amido apresenta baixa temperatura de pasta, alta viscosidade de pico, alta suscetibilidade ao atrito mecânico e baixa tendência a retrogradação e sinérese, sendo de grande digestibilidade (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008; VIEIRA; SARMENTO, 2008). As características estruturais do amido de mandioquinha-salsa são peculiares como baixo teor de amilose, grande quantidade tanto de cadeias laterais curtas (DP 6-12) como de cadeias laterais muito longas ($DP \geq 37$) da amilopectina, apesar de apresentar polimorfismo tipo B, e grânulos frágeis e quebradiços provavelmente devido a uma estrutura cristalina frágil (SANTACRUZ et al., 2002; ROCHA; JANE; FRANCO, s.d.(capítulo 2); ROCHA et al., 2010 (capítulo 3)).

O ‘annealing’ e a hidrólise enzimática de amidos granulares vêm sendo realizadas para promover um melhor entendimento da estrutura semicristalina dos amidos, como a amilose e a amilopectina estão distribuídas nos grânulos, e como influenciam a cristalinidade. O ‘annealing’ é um tratamento hidrotérmico que promove uma reorganização estrutural dos grânulos de amido em água a uma temperatura acima da de transição vítrea, mas inferior à temperatura de gelatinização (JACOBS et al, 1998a). As regiões amorfas são hidratadas durante o tratamento hidrotérmico causando uma maior mobilidade tanto das áreas amorfas quanto das cristalinas dos grânulos (PERRY; DONALD, 2000; BILIADERIS, 2009) resultando em uma otimização das duplas hélices e maior perfeição dos cristais (JAYAKODY; HOOVER, 2008).

A hidrólise enzimática do amido granular ocorre simultaneamente nas regiões amorfas e cristalinas (COLLONA; BULÉON; LEMANE, 1998). No entanto, as regiões amorfas são mais rapidamente degradadas (JACOBS et al., 1998b). Amidos de diferentes fontes botânicas, respondem de maneira diferente à hidrólise enzimática devido às variações estruturais dos amidos (COLONNA, BULÉON, LEMANE, 1988; HOOVER; ZHOU, 2003; LI et al., 2004; TESTER; QI; KARKALAS, 2006; ROCHA; CARNEIRO; FRANCO, 2010).

Em estudo prévio (ROCHA et al. (2010) , capítulo 3) foi verificado que o ‘annealing’ de amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata resultou na formação de novas interações entre as moléculas de amilopectina, o que causou uma maior exposição das moléculas de amilose à ação das enzimas α -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica. No entanto, não foi esclarecido o efeito do ‘annealing’ sobre a hidrólise enzimática da estrutura semicristalina desses amidos. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do ‘annealing’ nas características estruturais dos amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata submetidos à hidrólise enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata nativos, previamente isolados em laboratório como descrito por Rocha, Jane e Franco (s.d.) (capítulo 2) foram utilizados. As enzimas α -amilase de *Bacillus* sp. (A6380, Sigma Chemical CO., EUA), amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (A7420, Sigma Chemical CO., EUA) e isoamilase de *Pseudomonas* sp. (Megazyme International, Irlanda) foram usadas. Todos os reagentes foram puros para análise.

2.2. Métodos

2.2.1. Tratamento hidrotérmico ‘annealing’

Os amidos foram submetidos ao ‘annealing’ durante 24 horas, a 3 °C abaixo da temperatura inicial de gelatinização de cada amido (54 °C, 56 °C e 59 °C para os amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata, respectivamente) de acordo com procedimento de Rocha et al. (2010) (capítulo 3).

2.2.2. Hidrólise enzimática

2.2.2.1. Atividade da enzima α -amilase

A determinação da atividade em SKB da enzima α -amilase bacteriana foi calculada baseado na medida do tempo requerido para hidrolisar o amido a um tamanho definido de dextrina de acordo com método de Sandsted et al. (1939).

2.2.2.2. Atividade da enzima amiloglucosidase

A atividade da enzima amiloglucosidase foi determinada segundo Ueda et al. (1980), com modificações. A uma alíquota de 2,5 mL de solução de amido solúvel fervida 1% (p/v) foi adicionado 0,5 mL de tampão acetato (0,05 M e pH 4,5), 0,5 mL de água destilada e 0,5

mL de solução de enzima. A solução foi incubada à 55 °C por 10 minutos. Após este período, 1 mL da solução foi retirada e os açúcares redutores produzidos foram determinados pelo método de Somogyi (1945). Uma unidade de atividade (U) da amiloglucosidase fúngica foi definida como aquela quantidade de enzima que produz 1 mg glicose/mL da mistura de reação sob as condições descritas. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.2.3. Hidrólise enzimática com α -amilase e amiloglucosidase

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ foram hidrolisados com α -amilase (40 SKB/g de amido) e amiloglucosidase (8 U/g de amido) de acordo com procedimentos de Franco e Ciacco (1992) com modificações. Suspensões de amido (10% p/v) foram incubados a 37 °C por até 120 horas. A cada 6 horas, quantidade de açúcares redutores presentes no sobrenadante foi determinada de acordo com Somogyi (1945). A hidrólise enzimática foi interrompida segundo procedimento de Vieira e Sarmento (2008) e os resíduos da hidrólise, coletados após 12, 36 e 96 horas foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 38 °C por 12 horas.

2.2.3. Morfologia dos grânulos de amido

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’, antes e após hidrólise enzimática, foram desidratados com etanol, aplicados sobre fita adesiva de carbono dupla face que estava aderida a um disco metálico. As amostras receberam uma aplicação de uma camada de 20 nm de ouro e foram então observadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operando a uma aceleração de voltagem de 10 a 20 kV. Imagens foram obtidas com aumento de 1.000 e 2.000 vezes.

2.2.4. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina através de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência

2.2.4.1. Desramificação dos amidos

Os amidos foram desramificados, em duplicata, utilizando isoamilase seguindo procedimento de Wong e Jane (1995) com modificações. Suspensões de 0,5 mL dos amidos

em DMSO 90 % (10 mg/mL) foram agitados em banho de água fervente por 30 min e por mais 16 horas a temperatura ambiente. Adicionou-se 2 mL de etanol absoluto e o precipitado foi recuperado por centrifugação a 12000 g por 10 min. O precipitado foi suspenso em 1,8 mL de H₂O ultra pura (18 MΩ.cm) e mantido em banho de água fervente por 30 min com agitação. Após resfriar, 0,2 mL de tampão acetato 0,1M pH 3,5, 3 µL de solução de isoamilase (3 U) e 4 µL de solução de azida 10 % (p/v) foram adicionados e a suspensão foi mantida a 40 °C por 16h. Após este período, o pH foi ajustado para 6,5-7,0 com NaOH 1M e a suspensão foi mantida em banho de água fervente por 15 min. As amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22 µm e injetadas no cromatógrafo..

2.2.4.2. Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

A distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina foi avaliada num sistema HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40. As amostras preparadas como descrito em 2.2.4.1 foram automaticamente injetadas num 'loop' de 20 µL. A forma de onda empregada foi 'standard quadruple' com os seguintes potenciais de pulsos e durações: $E_1 = 0,10 \text{ V}$ ($t_1 = 0,40 \text{ s}$); $E_2 = -2,00 \text{ V}$ ($t_2 = 0,02 \text{ s}$); $E_3 = 0,60 \text{ V}$ ($t_3 = 0,01 \text{ s}$); $E_4 = -0,10 \text{ V}$ ($t_4 = 0,06 \text{ s}$). Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificados com N₂; eluente A consistia de 150 mM NaOH e o eluente B consistia de 500 mM acetato de sódio em 150 mM NaOH. Os componentes lineares foram separados numa coluna CarboPac PA-100 (250 x 4 mm) acoplada a uma guarda-coluna CarboPac PA-100, com gradiente linear de eluição (0 min, 28 % B; 15 min, 40 % B; 105 min, 72 % B) a uma temperatura de 40 °C e fluxo de 0,8 mL/min. Padrões de maltodextrinas com DP 1 a 7 (Sigma Chemical CO., EUA) foram usados para a identificação das séries homólogas de comprimento de cadeias. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). As amostras foram analisadas em duplicata.

2.2.5. Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade

As umidades das amostras foram equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25 °C, $a_w = 0.9$) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X dos

amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’, antes e após hidrólise enzimática, foram determinados utilizando-se uma unidade RINT2000 Wide Angle Goniometer, com radiação de Cu, linha K, $L = 1,542 \text{ \AA}$. A velocidade de varredura foi de 1° por minuto e as condições de uso foram de 50Kv e 100 mA. A porcentagem de cristalinidade foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e a área total seguindo método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA). Os gráficos foram suavizados utilizando o método ‘Adjacent Averaging’. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.6. Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos antes e após hidrólise enzimática foram determinadas através de calorímetro diferencial de varredura de acordo com método descrito por Franco et al. (2002). A taxa de aquecimento empregada foi de $5^\circ\text{C}/\text{min}$. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.7. Análise estatística

O delineamento experimental adotado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por duas ou três repetições. O programa Statistica for Windows (v. 5.0, Statsoft, Tulsa, OK) foi utilizado abrangendo a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética da hidrólise enzimática

Conforme apresentado por Rocha et al. (2010) (capítulo 3), tanto os amidos nativos quanto os submetidos ao ‘annealing’, com exceção do amido de batata, mostraram um aumento progressivo na porcentagem de hidrólise até aproximadamente 72h, após o que a velocidade de hidrólise reduziu e manteve-se praticamente inalterada até 120h de incubação (Figura 1).

O amido de batata se mostrou resistente à hidrólise enzimática, independentemente do

‘annealing’ e após 120h de incubação, este amido mostrou apenas 10% de hidrólise. Os amidos de mandioquinha-salsa e mandioca nativos apresentaram um perfil de hidrólise semelhante e ao final do tratamento estes amidos mostraram 53% (mandioquinha-salsa) e 56% (mandioca) de hidrólise.

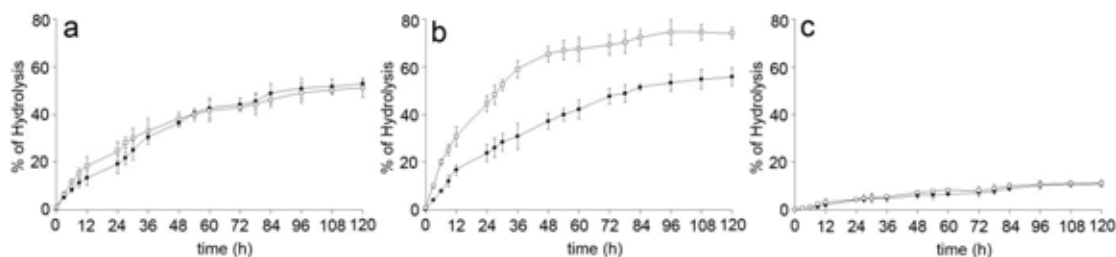


Figura 1. Perfil de hidrólise enzimática dos amidos antes (●) e após (□) ‘annealing’. (a) mandioquinha-salsa; (b) mandioca; (c) batata.

O ‘annealing’ alterou o modo de ação das enzimas sobre os grânulos de amidos de mandioquinha-salsa e mandioca. O primeiro mostrou-se ligeiramente mais suscetível à hidrólise enzimática nas primeiras 48 horas de incubação e então, manteve um perfil similar ao do amido nativo. No entanto, o amido de mandioca se tornou muito mais vulnerável à ação das enzimas após o tratamento hidrotérmico, atingindo 70% de hidrólise com 60h de incubação.

3.2. Morfologia dos grânulos de amido

Os grânulos de amidos de mandioquinha-salsa e mandioca mostraram formas arredondadas e alguns grânulos com extremidades truncadas, enquanto os grânulos do amido de batata apresentaram formatos elipsoidais ou ovalados e mostraram-se bem maiores que os demais (Figura 2a, 2e e 2i, respectivamente). A superfície granular de todos os amidos nativos apresentou-se predominantemente lisa. Após hidrólise, as superfícies dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa e mandioca mostraram-se mais rugosas, indicando um ataque por exocorrosão. Alguns grânulos do amido de mandioquinha-salsa foram atacados a partir do seu interior, provavelmente devido a alguma fissura presente no grânulo de amido ou ainda devido a alguma imperfeição decorrente do processo de extração do amido (Figura 2b ↓). Em alguns grânulos menores do amido de mandioca foi possível observar poros (Figura 2f ↓) indicando que a enzima atacou também o interior do grânulo de amido. Os grânulos do amido

de batata foram atacados de maneira pontual, formando algumas depressões como mostrado na Figura 2j ↓.

Segundo Oates (1997), amidos hidrolisados a partir de seu interior apresentam espaços na estrutura helicoidal das cadeias dos amidos que permitem o acesso das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, que possuem tamanho aproximado de 5 a 6 nm. Desta forma, amidos que são predominantemente hidrolisados por exocorrosão, como é o caso dos amidos de raízes e tubérculos, podem apresentar uma estrutura altamente empacotada na superfície granular.

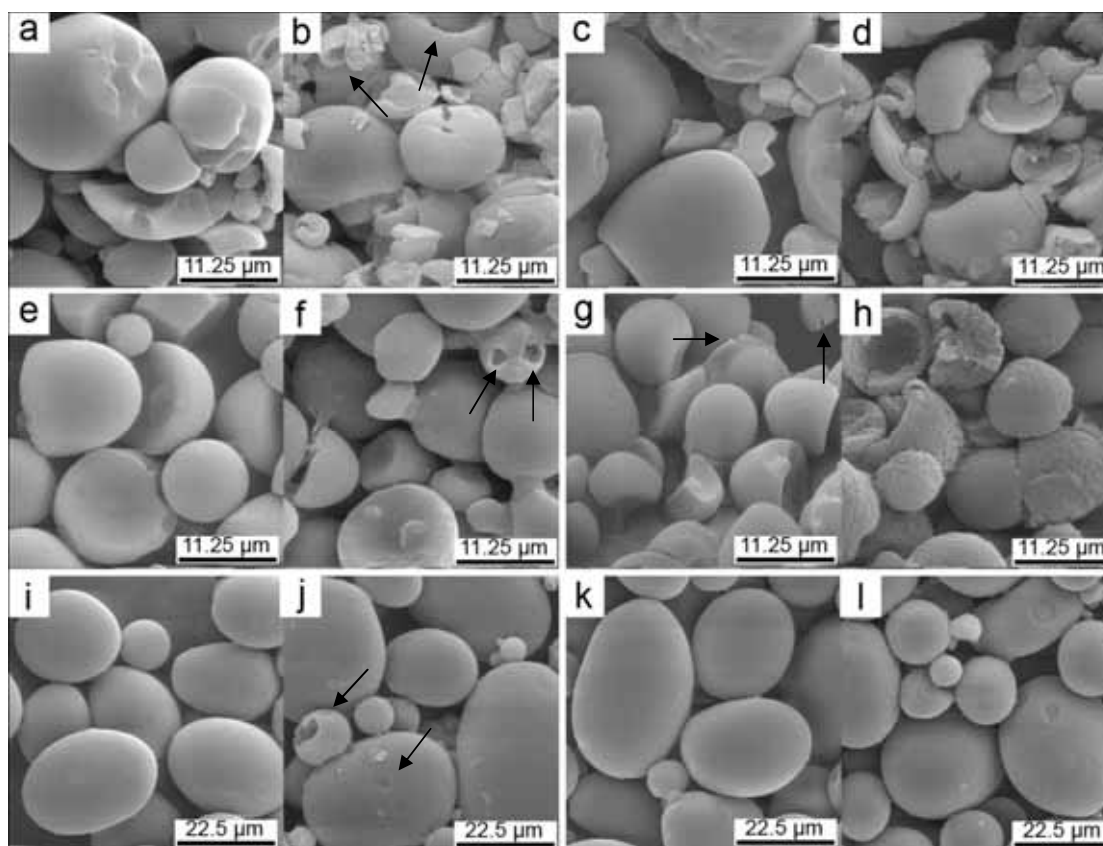


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos dos amidos submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’. Antes do ‘annealing’: mandioca-salsa (a) 0h, (b) 96h; mandioca (e) 0h, (f) 96h; batata (i) 0h, (j) 96h; Após ‘annealing’: mandioca-salsa (c) 0h, (d) 96h; mandioca (g) 0h, (h) 96h; batata (k) 0h, (l) 96h.

O tratamento hidrotérmico praticamente não alterou a morfologia ou a superfície dos grânulos de amido, com exceção do amido de mandioca que mostrou algumas fissuras sobre sua superfície (Figura 2g ↓). Os grânulos de amido submetidos ao ‘annealing’ e ao tratamento

enzimático mostraram superfícies muito mais rugosas decorrentes da degradação enzimática por exocorrosão. Muitos grânulos do amido de mandioquinha-salsa apresentaram-se quebrados, e corroídos, mostrando a típica estrutura de camadas. O grande número de grânulos quebrados para o amido de mandioquinha-salsa pode estar relacionada à sua estrutura frágil e com defeitos relatada em estudo prévio por Rocha et al (2010) (capítulo 3). No caso do amido de mandioca, a maior intensidade da degradação granular foi evidente (Figura 2h ↓), confirmando a maior suscetibilidade deste amido às enzimas após ‘annealing’. Rocha et al. (2010) (capítulo 3), verificaram que as moléculas de amilose dos amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata foram muito mais degradadas pelas enzimas após o ‘annealing’. É possível que as moléculas de amilose estivessem localizadas mais na periferia dos grânulos devido à maior degradação por exocorrosão apresentada para este amido o que concordaria com estudos de Jane (2006), que sugeriu estar a amilose mais concentrada na periferia dos grânulos do que em seu interior.

3.3. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina

Enquanto o amido de batata mostrou alta proporção de cadeias longas, o amido de mandioca mostrou alta proporção de cadeias curtas. O amido de mandioquinha-salsa mostrou um perfil intermediário entre esses dois amidos mostrando tanto maiores proporções de cadeias longas, quanto altas proporções de cadeias curtas. Os amidos de mandioquinha-salsa e mandioca apresentaram ombros na distribuição entre DP 18-24, que seriam indicativos de defeitos na estrutura granular destes amidos (JANE et al., 1999; GENKINA et al., 2007). O ‘annealing’ não provocou qualquer mudança na distribuição de cadeias ramificadas dos amidos, como esperado. Resultados semelhantes foram observados em trabalho anterior (Rocha et al., 2010) quando a distribuição de comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina destes amidos foi determinada a partir de FACE.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina do amido de mandioquinha-salsa, antes e após o ‘annealing’, em diferentes tempos de hidrólise. Houve um aumento substancial da proporção de cadeias com DP 2-12, e redução quase total das cadeias com $DP \geq 37$ até 36h de hidrólise, o que provocou redução do DP médio das cadeias de amilopectina deste amido. Esses resultados também podem ser claramente observados nos perfis de distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina nos diferentes tempos de hidrólise (Figura 3).

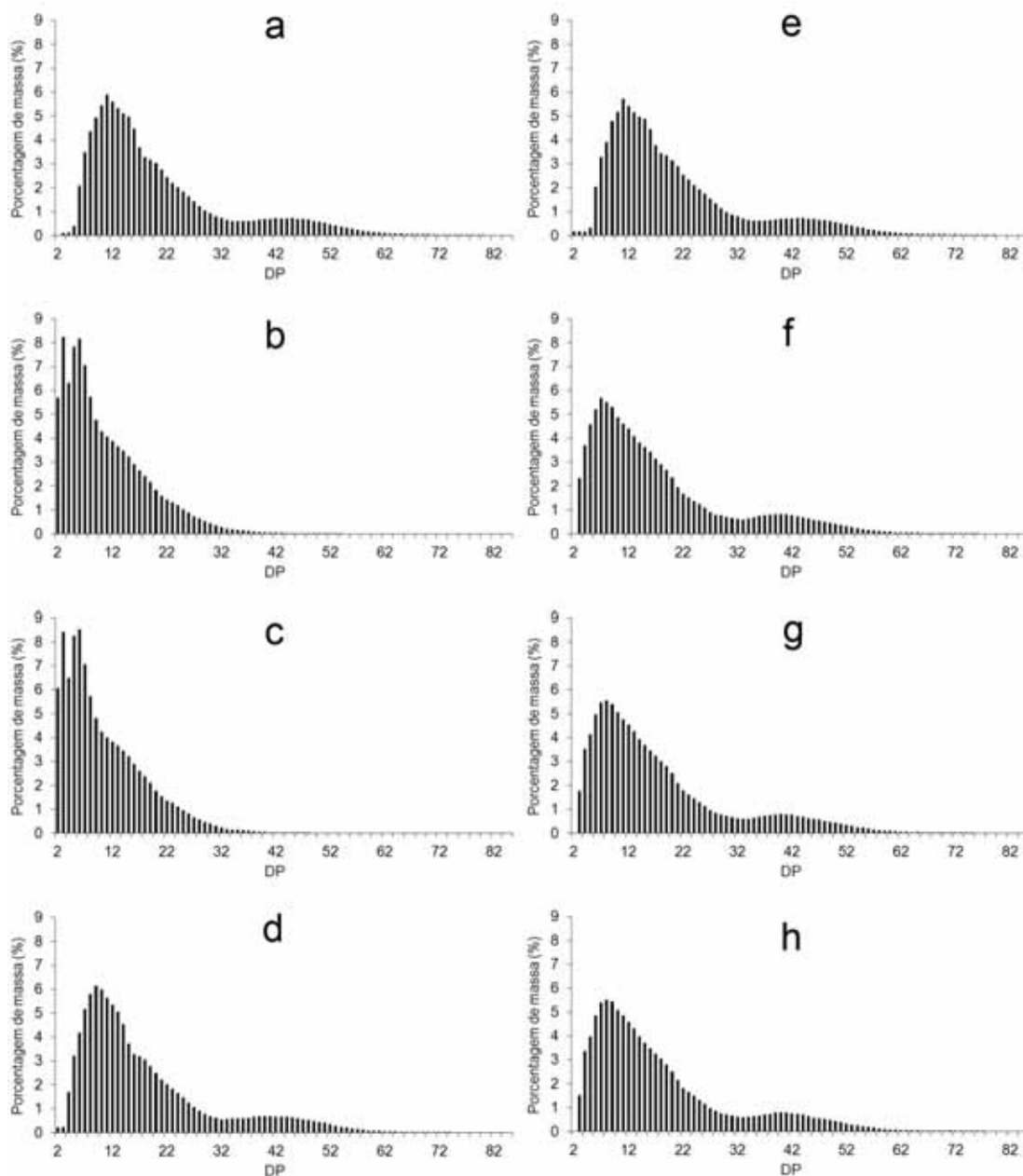


Figura 3. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise enzimática. Antes do ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h. Após ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h.

Houve o desaparecimento do segundo pico da distribuição correspondente às cadeias laterais longas da amilopectina e aumento substancial na proporção de cadeias com DP < 12 (Figuras 3b, 3c). Estes resultados indicaram que nas primeiras 36h de hidrólise, a ação das enzimas foi mais efetiva sobre as cadeias longas da amilopectina que foram degradadas a

cadeias de menor DP. Os resíduos da hidrólise obtidos com 96h de tratamento voltaram a apresentar maior quantidade de cadeias longas e poucas cadeias com DP 2-5. Isso ocorreu provavelmente devido à contínua degradação das cadeias muito curtas a açúcares solúveis e à localização de algumas cadeias longas em regiões mais internas nas lamelas cristalinas que permaneceram protegidas do ataque das enzimas.

Tabela 1. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0h	0,43 ^f	29,82 ^{cd}	42,64 ^a	13,31 ^a	13,80 ^a	20,76 ^a
12h	27,87 ^b	37,52 ^a	27,74 ^e	5,96 ^c	0,91 ^c	11,48 ^c
36h	29,17 ^a	38,06 ^a	27,51 ^e	4,93 ^c	0,33 ^c	10,39 ^c
96h	5,33 ^e	38,23 ^a	35,77 ^b	9,63 ^b	11,04 ^b	17,66 ^b
Após ‘annealing’						
0h	0,64 ^f	31,25 ^c	42,77 ^a	12,30 ^a	13,04 ^a	20,26 ^a
12h	10,62 ^c	35,57 ^b	32,51 ^d	9,44 ^b	11,87 ^b	17,48 ^b
36h	9,39 ^{cd}	35,72 ^b	33,77 ^{cd}	9,43 ^b	11,69 ^b	17,62 ^b
96h	8,83 ^d	35,68 ^b	34,14 ^c	9,52 ^d	11,83 ^b	17,78 ^b

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Após ‘annealing’ houve aumento nas proporções de cadeias com DP 2-5, porém sem redução substancial nas cadeias muito longas da amilopectina com o decorrer da hidrólise (Figura 3 f-h). O rearranjo estrutural causado pelo tratamento hidrotérmico sobre o amido de mandioquinha-salsa provocou um efeito protetor das cadeias ramificadas longas da amilopectina provavelmente devido a uma maior interação entre essas moléculas.

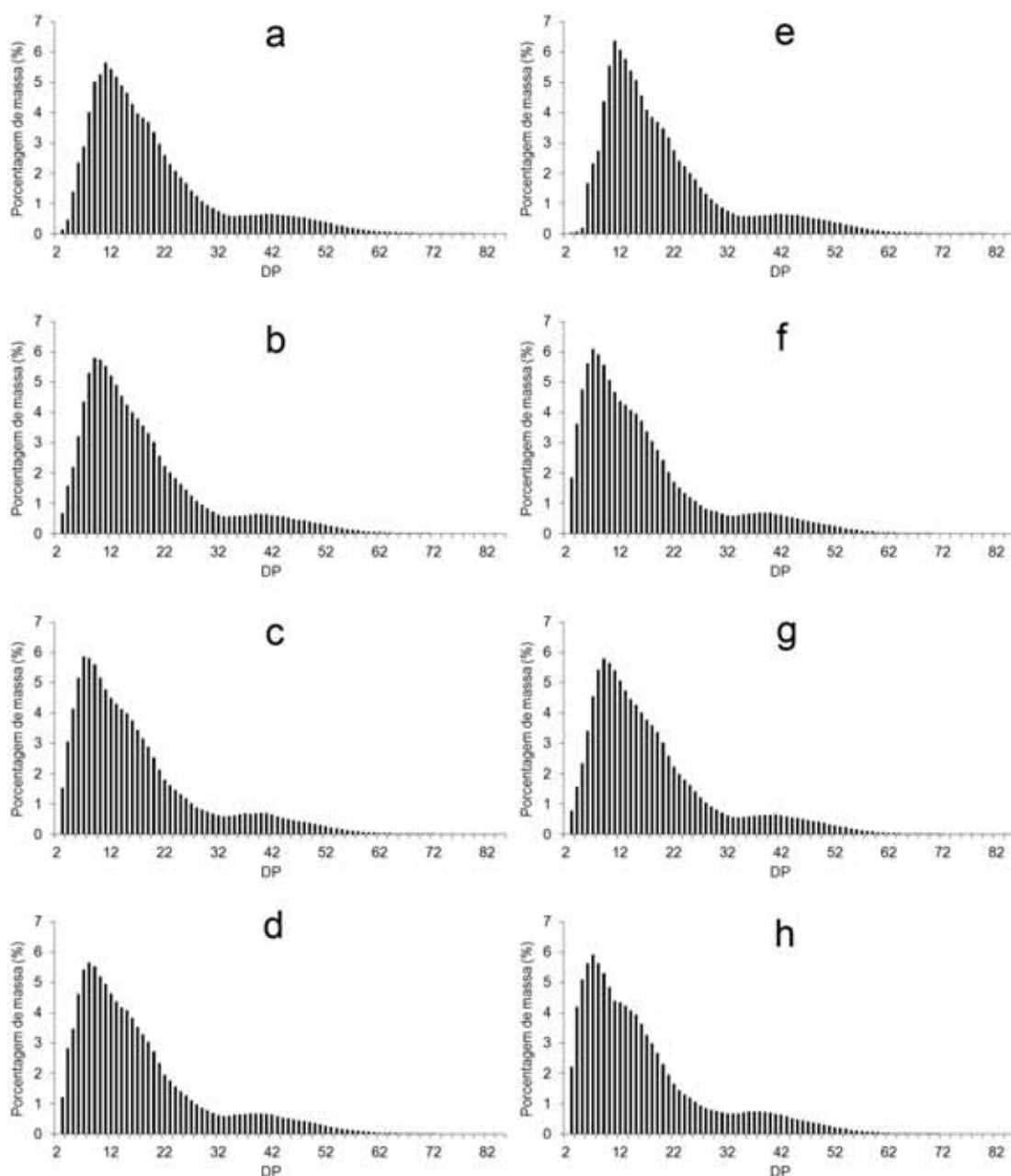


Figura 4. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise enzimática. Antes do ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h. Após ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h.

O ataque das enzimas sobre o amido de mandioca nativo provocou ligeiro aumento na proporção de cadeias curtas (DP 2-12) com o aumento do tempo de hidrólise, porém menos expressivo do que o apresentado para o amido de mandioquinha-salsa nativo. A proporção de cadeias com $DP \geq 37$ reduziu com 12h de tratamento enzimático e manteve-se constante nos

tempos seguintes (Tabela 2). Em estudo anterior (ROCHA et al. (2010) (capítulo 3)) foi observado que a massa molar média das moléculas de amilopectina do amido de mandioca praticamente não se alterou com a hidrólise, enquanto o teor de amilose aparente deste amido diminuiu. Estes resultados sugerem que as enzimas degradaram preferencialmente as moléculas de amilose do amido de mandioca.

Tabela 2. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0h	1,59 ^d	30,92 ^c	44,17 ^b	12,18 ^a	11,14 ^a	19,56 ^a
12h	4,46 ^c	35,11 ^b	40,01 ^c	10,77 ^b	9,64 ^b	17,99 ^b
36h	8,73 ^b	36,83 ^a	35,12 ^{de}	9,70 ^c	9,62 ^b	16,96 ^{bc}
96h	7,51 ^b	35,98 ^a	36,60 ^d	10,15 ^{bc}	9,76 ^b	17,37 ^b
Após ‘annealing’						
0h	0,55 ^e	29,28 ^c	46,25 ^a	12,78 ^a	11,13 ^a	19,94 ^a
12h	4,67 ^c	35,24 ^b	39,81 ^c	10,59 ^b	9,68 ^b	17,93 ^b
36h	10,21 ^a	37,29 ^a	34,11 ^{ef}	9,23 ^c	9,17 ^b	16,48 ^c
96h	11,48 ^a	36,02 ^a	33,40 ^f	9,74 ^c	9,35 ^b	16,52 ^c

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A ação das enzimas sobre o amido de mandioca após tratamento hidrotérmico mostrou uma distribuição de cadeias ramificadas com maior proporção de cadeias com DP 2-12 do que o apresentado pelo amido nativo a partir de 36h de hidrólise. É possível que estas cadeias tenham sido provenientes da ação das enzimas principalmente sobre as cadeias com DP 13-24 (Tabela 2). A intensidade do ombro no perfil de distribuição das cadeias ramificadas deste amido (Figuras 4f, 4g e 4h) aumentou, sugerindo a formação de cadeias curtas, as quais são incapazes de formar duplas hélices, localizadas na região cristalina (JANE et al., 1999; GENKINA et al., 2007). Estes resultados indicam que, mesmo não ocorrendo alteração da massa molar média da amilopectina antes e após ‘annealing’, como observado por Rocha et al. (2010) (capítulo 3), a estrutura cristalina deste amido se tornou mais suscetível à ação das enzimas após o tratamento hidrotérmico.

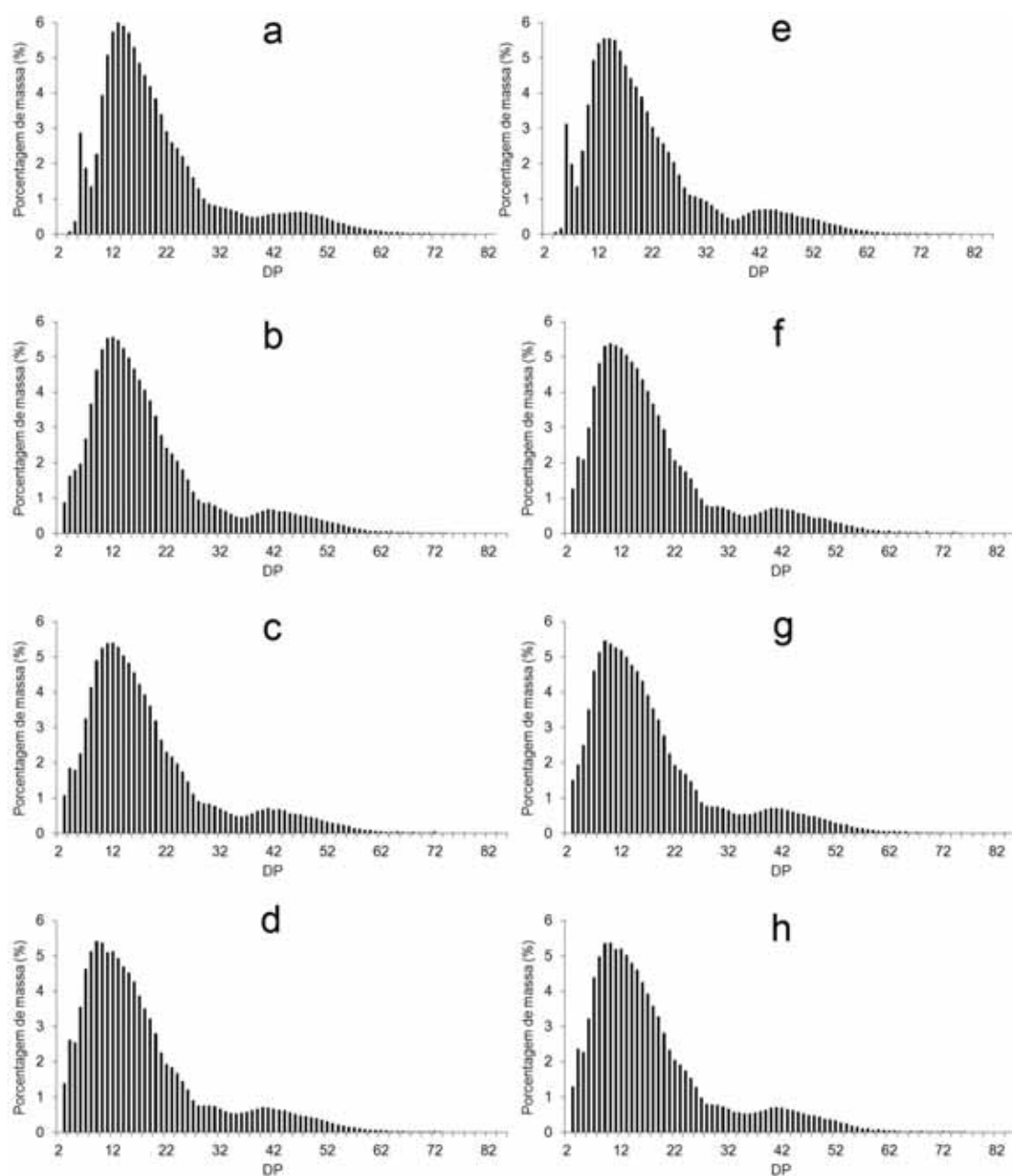


Figura 5. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de batata submetidos à hidrólise enzimática. Antes do ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h. Após ‘annealing’: (a) 0h; (b) 12h; (c) 36h; (d) 96h.

Os amidos de batata nativo e submetido ao ‘annealing’ não apresentaram mudanças significativas na distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina após ação enzimática (Figura 5), provavelmente devido a baixa suscetibilidade destes amidos às enzimas. A

proporção de cadeias com $DP \geq 37$ reduziu ligeiramente com 12h de tratamento enzimático e permaneceu constante com o decorrer da hidrólise. No entanto, as cadeias com DP 13-24 e DP 25-36 foram as mais atacadas promovendo um aumento na proporção de cadeias curtas (DP 2-12) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos de batata submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0h	0,47 ^d	23,20 ^d	51,75 ^a	13,04 ^a	11,54 ^a	20,65 ^a
12h	4,30 ^c	29,26 ^c	45,34 ^b	10,75 ^b	10,34 ^b	18,83 ^b
36h	4,72 ^{bc}	30,55 ^c	43,70 ^c	10,49 ^b	10,54 ^b	18,64 ^b
96h	6,56 ^a	34,29 ^a	39,47 ^e	9,40 ^c	10,28 ^b	17,74 ^b
Após ‘annealing’						
0h	0,35 ^d	22,82 ^d	51,02 ^a	13,98 ^a	11,82 ^a	20,88 ^a
12h	5,54 ^b	33,23 ^b	41,06 ^d	9,60 ^{bc}	10,58 ^b	18,14 ^b
36h	5,94 ^{ab}	34,48 ^a	39,72 ^e	9,38 ^c	10,49 ^b	17,86 ^b
96h	5,93 ^{ab}	33,68 ^{ab}	40,29 ^{de}	9,71 ^{bc}	10,39 ^b	17,98 ^b

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4. Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ foram avaliados quanto ao seu padrão cristalino antes e após hidrólise enzimática. Os padrões de difração de raios-X dos amidos de mandioquinha-salsa e batata foram do tipo B e o amido de mandioca apresentou padrão tipo C_A. Após o ‘annealing’, esses padrões não foram alterados, como também observado em trabalho anterior (ROCHA et al. (2010) (capítulo 3)). A hidrólise enzimática não alterou o padrão de difração de raios-X dos amidos de mandioquinha-salsa e batata, independentemente do ‘annealing’, mesmo após 96h de reação, apesar de ter provocado redução na intensidade dos picos (Figura 6a e 6c). Resultados similares foram obtidos por O’Brien e Wang (2008) para amidos de milho normal, milho ceroso, milho com alto teor de amilose e batata, submetidos a um processo de ‘annealing’ em duas etapas e hidrolisados por α -amilase ou amiloglucosidase. Por outro lado, o amido de mandioca que apresentou o padrão tipo C_A, independentemente do ‘annealing’, passou a apresentar após hidrólise o padrão tipo A. Isso ocorreu porque com a hidrólise, tanto o amido nativo quanto aquele submetido ao ‘annealing’

deixaram de mostrar em seus difractograma o pico a 5,5° em 2 θ , típico do padrão cristalino tipo B. Estes resultados sugerem que os cristais tipo B, presentes no amido de mandioca foram preferencialmente atacados pelas enzimas.

Os cristais tipo B apresentam uma estrutura hexagonal menos compacta e o centro entre as hélices é mais hidratado (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; JANE, 2006) permitindo uma ação mais efetiva da enzima. Já os cristais tipo A apresentam uma estrutura monoclinica mais compacta e menos hidratada. Deste modo, apesar dos amidos com padrão cristalino tipo A serem mais suscetíveis às enzimas em função da maior quantidade de cadeias ramificadas curtas da amilopectina destes amidos, que formam duplas hélices mais curtas (JANE, 2006; TESTER; QI; KARKALAS, 2006), é possível que, após as enzimas penetrarem nos grânulos de amido que apresentam misturas de cristais tipo A e B, os cristais tipo B sejam preferencialmente atacados.

Tabela 4. Porcentagem de cristalinidade dos amidos submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Antes do ‘annealing’		Após ‘annealing’	
	0h	96h	0h	96h
Mand-salsa	37,1 ^b	34,7 ^d	43,1 ^a	36,5 ^c
Mandioca	36,2 ^{ab}	34,0 ^c	37,0 ^a	35,6 ^{bc}
Batata	38,3 ^b	33,9 ^d	41,1 ^a	35,4 ^c

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A porcentagem de cristalinidade dos amidos submetidos ou não ao ‘annealing’, reduziu após tratamento enzimático. Estes dados aliados ao fato das enzimas terem degradado principalmente as cadeias laterais com DP $\geq$ 37 (Tabelas 1 a 3) sugerem que a atuação das enzimas nas áreas cristalinas dos amidos influenciou a organização estrutural dos grânulos.

O aumento na porcentagem de cristalinidade dos amidos de mandioquinha-salsa e batata, provocado pelo ‘annealing’, manteve-se mesmo após a hidrólise enzimática. Isto sugere que a maior organização da estrutura cristalina causada pelo tratamento hidrotérmico ainda foi mantida, mesmo após ação das enzimas α -amilase e amiloglucosidase.

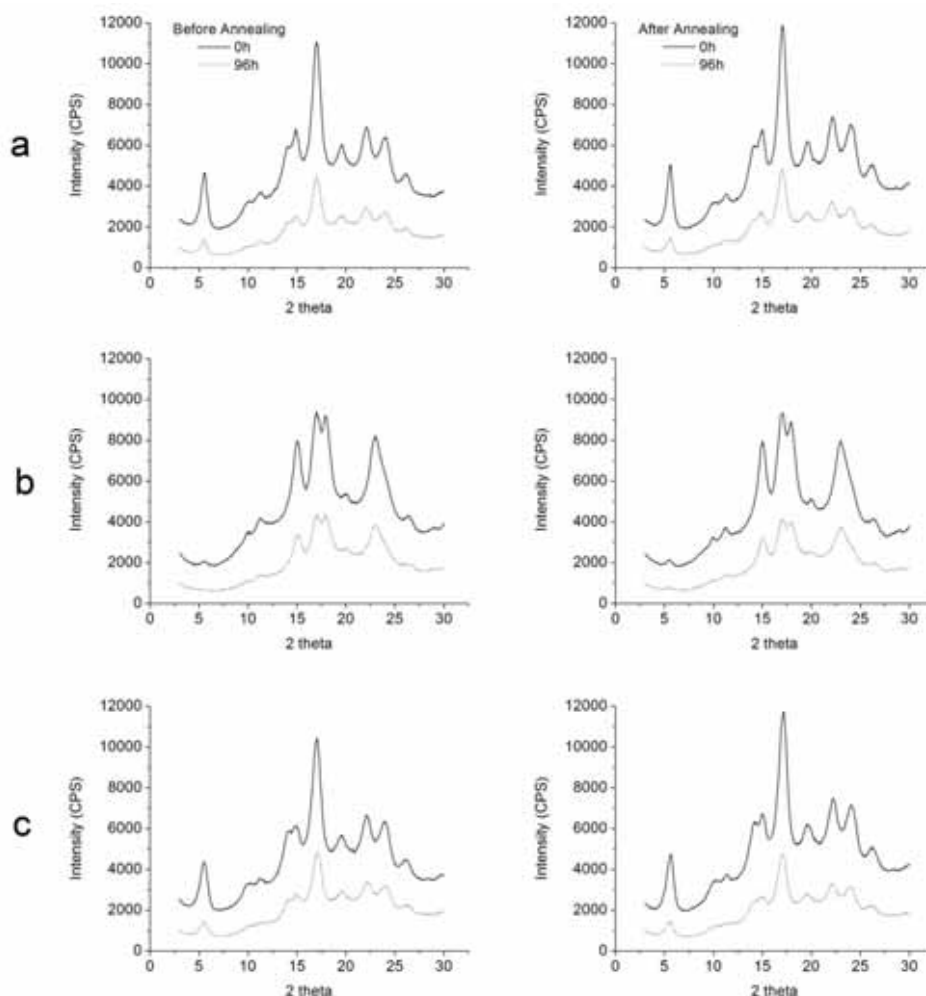


Figura 6. Difratogramas de raios-X dos amidos submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’: (a) mandioca-salsa; (b) mandioca; (c) batata.

3.5. Propriedades térmicas

O amido de mandioca-salsa nativo apresentou aumento gradual das temperaturas iniciais e de pico de gelatinização com o tempo de hidrólise (Tabela 5). Aumentos nas temperaturas de gelatinização são indicativos de hidrólise das regiões amorfas dos grânulos, resultando em um material mais cristalino que necessita de temperaturas maiores para sua fusão (O'BRIEN; WANG, 2008). Estes resultados concordam com aqueles obtidos em estudo prévio de Rocha et al. (2010) (capítulo 3) em que foi verificado que as moléculas de amilose deste amido apresentaram degradação progressiva com o tempo de hidrólise.

A variação de entalpia (ΔH) do amido de mandioca-salsa nativo diminuiu durante

a hidrólise enzimática, indicando que as regiões cristalinas deste amido foram atacadas.

Após o tratamento hidrotérmico, as temperaturas de início e pico de gelatinização também aumentaram com a hidrólise, sugerindo degradação das regiões amorfas pelas enzimas. O ΔH do amido de mandioquinha-salsa submetido ao ‘annealing’ também diminuiu com a hidrólise enzimática. Mesmo tendo o tratamento hidrotérmico provocado um efeito protetor das cadeias longas da amilopectina devido a uma maior interação amilopectina/amilopectina (Figura 3), as enzimas ainda conseguiram atacar estas moléculas resultando em redução da porcentagem de cristalinidade (Tabela 4). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Rocha et al. (2010) (capítulo 3) que observaram leve redução da massa molar média deste amido durante a hidrólise enzimática. Isto pode ter causado uma diminuição da ordem helicoidal dos amidos e, conseqüentemente, diminuição do ΔH .

Tabela 5. Propriedades térmicas dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’.

Tempo de hidrólise (h)	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0h	56,99 ^e	60,29 ^e	64,42 ^e	7,43	16,8 ^b
12h	58,67 ^d	61,61 ^d	65,20 ^d	6,53	15,5 ^c
36h	59,95 ^c	62,51 ^c	65,61 ^d	5,66	16,1 ^{bc}
96h	60,54 ^c	62,90 ^c	65,41 ^d	4,87	14,8 ^{cd}
Após ‘annealing’					
0h	61,85 ^b	64,45 ^b	67,40 ^c	5,55	17,8 ^a
12h	64,02 ^a	66,52 ^a	69,66 ^a	5,65	15,8 ^c
36h	63,96 ^a	66,18 ^a	68,75 ^b	4,79	15,5 ^c
96h	64,64 ^a	66,67 ^a	69,24 ^{ab}	4,59	14,5 ^d

^a Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; $\Delta T = T_f - T_0$; ΔH = variação de entalpia.

A temperatura inicial de gelatinização do amido de mandioca nativo foi reduzida com 12h de tratamento enzimático mantendo-se então constante nos tempos seguintes (Tabela 6). No entanto, um aumento na temperatura de pico foi observado, sugerindo que, assim como observado para o amido de mandioquinha-salsa nativo, o ataque das enzimas sobre as moléculas de amilose deste amido levou à formação de um material mais cristalino. O ΔH do amido de mandioca nativo também diminuiu durante a hidrólise enzimática, o que confirma o ataque enzimático às regiões cristalinas deste amido.

As temperaturas de início e de pico de gelatinização do amido de mandioca

aumentaram após ‘annealing’. Em trabalho prévio (ROCHA et al., 2010 (capítulo 3)), foi observado que as moléculas de amilose deste amido se tornaram muito mais suscetíveis à ação das enzimas após o ‘annealing’, o que provocou um aumento da suscetibilidade enzimática (Figura 1b). Assim, um resíduo da hidrólise mais cristalino foi obtido, resultando no aumento das temperaturas de gelatinização deste amido. No entanto, a redução no ΔH foi mais intensa do que a observada para o amido nativo, devido à maior formação de cadeias mais curtas da amilopectina (Figura 4) que não são capazes de formar duplas hélices (JANE et al., 1999; GENKINA et al., 2007).

Tabela 6. Propriedades térmicas dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise enzimática, antes e após ‘annealing’.

Tempo de hidrólise (h)	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0h	59,10 ^e	67,28 ^f	74,63 ^{de}	15,53	13,6 ^a
12h	58,06 ^f	69,19 ^c	78,21 ^{ab}	20,15	13,3 ^a
36h	58,00 ^f	68,61 ^d	75,23 ^d	17,23	11,5 ^b
96h	57,85 ^f	68,02 ^e	74,94 ^{de}	17,09	12,0 ^b
Após ‘annealing’					
0h	65,30 ^d	69,28 ^c	74,25 ^e	8,95	13,9 ^a
12h	70,02 ^c	73,78 ^b	79,01 ^a	8,99	10,2 ^c
36h	70,64 ^{bc}	73,68 ^b	77,39 ^{bc}	6,75	10,2 ^c
96h	71,88 ^a	74,82 ^a	78,34 ^a	6,46	9,5 ^d

^a Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; $\Delta T = T_f - T_0$; ΔH = variação de entalpia.

O amido de batata nativo também apresentou aumento nas temperaturas de início e de pico de gelatinização. Este amido foi o mais resistente à hidrólise pelas enzimas α -amilase e amiloglucosidase e desta forma, não era esperado grandes variações no seu perfil endotérmico. Em estudos realizados com amidos de batata e ervilha, Jacobs et al. (1998b) verificaram a ocorrência do ‘annealing’ na temperatura de incubação, realizando um experimento nas mesmas condições da hidrólise enzimática, porém sem a adição de enzimas. É possível que o aumento observado nas temperaturas de gelatinização do amido de batata tenha sido provocado não pela ação das enzimas, mas por um sutil ‘annealing’ dos amidos a 37 °C (temperatura de incubação durante a hidrólise enzimática). O ΔH do amido de batata nativo permaneceu inalterado durante os diferentes tempos de hidrólise enzimática. Apesar de ter sido observado redução da porcentagem de cristalinidade (Tabela 4) e redução do DP

médio da amilopectina deste amido (Tabela 3), mostrando a degradação das regiões cristalinas, o ΔH constante durante a hidrólise enzimática é plausível já que o amido de batata apresentou baixa taxa de hidrólise (Figura 1c).

Tabela 7. Propriedades térmicas dos amidos de batata submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Tempo de hidrólise (h)	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0h	62,04 ^c	64,75 ^e	68,59 ^d	6,55	15,5 ^c
12h	62,35 ^c	65,04 ^{de}	68,82 ^{cd}	6,47	15,8 ^c
36h	62,44 ^c	65,23 ^d	68,91 ^{bcd}	6,47	15,3 ^c
96h	63,20 ^b	65,83 ^c	69,40 ^b	6,20	15,6 ^c
Após ‘annealing’					
0h	67,71 ^a	69,93 ^{ab}	72,91 ^a	5,20	17,9 ^a
12h	67,42 ^a	69,88 ^{ab}	73,01 ^a	5,59	16,6 ^b
36h	67,28 ^a	69,80 ^{ab}	72,83 ^a	5,55	16,2 ^b
96h	67,75 ^a	70,20 ^a	73,13 ^a	5,39	16,9 ^b

^a Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); * T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; $\Delta T = T_f - T_0$; ΔH = variação de entalpia.

Como as temperaturas de gelatinização dos amidos de batata submetidos ao tratamento hidrotérmico não se alteraram, a possibilidade de ter ocorrido ‘annealing’ do amido nativo na temperatura de incubação (37 °C) durante a hidrólise enzimática é reforçada. Esta observação se justifica com base nas diferenças entre as temperaturas iniciais de gelatinização dos amidos e a temperatura de incubação (25 °C para o amido nativo e 31 °C para o amido submetido ao ‘annealing’). Quanto mais próxima a temperatura em que o amido é submetido ao annealing da temperatura inicial de gelatinização, maiores são os efeitos do tratamento hidrotérmico (JACOBS et al., 1998b).

Após o ‘annealing’, o amido de batata, apesar da baixa taxa de hidrólise, mostrou redução do ΔH após 12h de hidrólise, após o que permaneceu inalterado. Esta redução sugere uma sutil ação das enzimas nas áreas cristalinas, concordando com os resultados de distribuição de cadeias ramificadas da amilopectina deste amido (Tabela 3).

4. CONCLUSÃO

A cinética de hidrólise enzimática dos amidos granulares foi semelhante para os

amidos de mandioquinha-salsa e mandioca nativos. O amido de batata nativo foi o mais resistente dentre os três amidos estudados. A ação das enzimas sobre a estrutura semicristalina dos amidos mostrou-se dependente da fonte botânica. As enzimas atacaram as cadeias laterais longas ($DP > 37$) da amilopectina dos amidos, mas mais intensamente no amido de mandioquinha-salsa. A degradação da amilopectina pelas enzimas resultou em redução do ΔH de gelatinização dos amidos e queda na porcentagem de cristalinidade. No entanto, o padrão de difração de raios-X não foi alterado com a hidrólise, com exceção do amido de mandioca que teve o padrão tipo C_A alterado para tipo A, sugerindo ataque preferencial das enzimas aos cristais tipo B presentes neste amido.

O tratamento hidrotérmico alterou o modo de ação das enzimas sobre os amidos de mandioquinha-salsa e mandioca, resultando em maior taxa de hidrólise durante as primeiras 48h para o amido de mandioquinha-salsa e durante todo o período de hidrólise para amido de mandioca. A taxa de hidrólise do amido de batata permaneceu inalterada. A reorganização estrutural causada pelo ‘annealing’ provocou maior degradação por exocorrosão provavelmente devido à maior exposição das moléculas de amilose presentes principalmente na superfície dos grânulos. No caso do amido de mandioca, as fissuras apresentadas nos grânulos podem ter induzido a uma endocorrosão também elevando a suscetibilidade enzimática deste amido. O ‘annealing’ resultou num efeito protetor das cadeias longas da amilopectina do amido de mandioquinha-salsa devido à maior interação entre amilopectina/amilopectina. Já para os amidos de mandioca e batata o tratamento expôs mais as cadeias com DP 13-24 à ação enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILIADERIS, C. G. Structural transitions and related physical properties of starch. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and technology**. Burlington: Academic Press. 2009. p. 293-372. 3a. ed.
- COLONNA, P.; BULÉON, A.; LEMANE, F. Action of bacillus subtilis α -amylase on native wheat starch. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 9, p. 895-904, 1988.
- FRANCO, C. M. L., CIACCO, C. F. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules. Effect of size of the granules. **Starch/Stärke**, v. 44, n. 11, p. 422-426, 1992.
- FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.
- 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.
- HOOVER, R.; ZHOU, Y. In vitro and in vivo hydrolysis of starches by α -amylase and resistant starch formation

in legumes – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 401-417, 2003.

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, 1998a.

JACOBS, H.; EERLINGEN, R. C.; SPAEPEN, H.; GROBET, P. J.; DELCOUR, J. A. Impact of annealing on the susceptibility of wheat, potato and pea starches to hydrolysis with pancreatin. **Carbohydrate Research**, v. 305, n. 2, p. 193-207, 1998b.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205-213, 2006.

JANE, J. Structural features of starch granules II. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and technology**. Burlington: Academic Press. 2009. p. 193-236. 3a. ed.

JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 629-637, 1999.

JAYAKODY, L.; HOOVER, R. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 691-703, 2008.

LI, J. H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B. G. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 621-632, 2004.

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.

O'BRIEN, S.; WANG, Y. Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 4, p. 597-607, 2008.

OATES, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 11, p. 375-382, 1997.

PERRY, P. A.; DONALD, A. M. SANS study of the distribution of water within the starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 31-39, 2000.

ROCHA, T. S.; CARNEIRO, A. P. A.; FRANCO, C. M. L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of different granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 540-547, 2010.

ROCHA, T. S.; CUNHA, V. A. G.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Structural characterization of Peruvian carrot starch and effect of annealing on its semi-crystalline structure. **Carbohydrate Polymers**, *submetido*, 2010.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.

ROCHA, T. S.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Caracterização físico-química e estrutural de amidos de diferentes fontes botânicas, 28 p. Trabalho não publicado.

SANDSTED, R. M.; KNEEN, E.; BLISH, M. J. A standardized wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. **Cereal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 712-723, 1939.

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

SOMOGYI, M. New reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, n. 1, p. 61-68, 1945.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, n. 1-2, p. 39-54, 2006.

UEDA, S.; ZENIN, C. T.; MONTEIRO, D. A.; PARK, Y. K. Production of ethanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 2, p. 291-299, 1980.

VIEIRA, F. C.; SARMENTO, S. B. S. Heat-moisture treatment and enzymatic digestibility of Peruvian carrot, sweet potato and ginger starches. **Starch/Stärke**, v. 60, n. 5, p. 223-232, 2008.

WONG, K. S.; JANE, J. Effects of pushing agents on the separation and detection of debranched amylopectin by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 1, p. 63-80, 1995.

Capítulo 6

Estudo da suscetibilidade ácida de diferentes amidos submetidos ao ‘annealing’

Thaís S. Rocha; Florence A. Souza; Rafaela S. Branzani Célia M. L. Franco

UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do ‘annealing’ na suscetibilidade dos amidos de milho normal, milho ceroso, mandioquinha-salsa, mandioca e batata à ação do ácido clorídrico. Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ por 24h a 3 °C abaixo da temperatura inicial de gelatinização de cada amido (63 °C, 62 °C, 54 °C, 56 °C e 59 °C para os amidos de milho normal, milho ceroso, mandioquinha-salsa, mandioca e batata, respectivamente) foram suspensos em ácido clorídrico 2,2 M a 35 °C por 21 dias. O amido de mandioquinha-salsa foi o mais suscetível à hidrólise ácida enquanto o amido de batata foi o mais resistente. O ‘annealing’ resultou em maior suscetibilidade das regiões amorfas dos grânulos, evidenciada pela queda mais expressiva dos teores de amilose. Estruturas poligonais com superfícies facetas e extremidades pontiagudas foram observadas nos grânulos através de MEV tanto antes quanto após o ‘annealing’. Através de HPAEC-PAD, verificou-se que as cadeias longas das amilopectinas dos amidos nativos foram principalmente atacadas e as cadeias com DP 13-24 foram as mais resistentes. No entanto, após ‘annealing’, os amidos apresentaram diferenças na degradação das cadeias da amilopectina, com exceção dos amidos de milho normal e batata que apresentaram degradação similar a dos amidos nativos. Maior resistência de cadeias com DP 13-24 foi observada para o amido de milho ceroso, enquanto que estas cadeias se tornaram mais suscetíveis para o amido de mandioca. Para o amido de mandioquinha-salsa as cadeias com DP 6-12 passaram a ser mais atacadas. A ação do ácido sobre as moléculas de amilopectina dos amidos resultou em queda nos seus ΔH de gelatinização, conforme observado por DSC. Estes resultados mostraram que a suscetibilidade ao ácido e os efeitos do ‘annealing’ dependem da fonte botânica dos amidos e de suas características estruturais.

1. INTRODUÇÃO

Os amidos consistem principalmente de duas α -glucanas, amilose e amilopectina, que estão arrançadas nos grânulos em regiões amorfas e cristalinas formando uma estrutura de camadas com alternados altos e baixos índices de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e a enzimas. O ‘annealing’ de amidos é um tratamento hidrotérmico que promove uma reorganização da estrutura dos grânulos devido à hidratação das regiões amorfas que resulta em um aumento na mobilidade tanto das áreas amorfas quanto das áreas cristalinas (PERRY; DONALD, 2000; JAYAKODY; HOOVER, 2008; BILIADERIS, 2009). Esta maior mobilidade das áreas amorfas e cristalinas dos grânulos permite um melhor empacotamento das duplas hélices levando a uma maior perfeição dos cristais de amido. Consequentemente, aumentos nas temperaturas de gelatinização dos amidos ocorrem (GENKINA; WASSERMAN; YURYEV, 2004; KISELEVA et al., 2005), com possível aumento na variação de entalpia de gelatinização e na cristalinidade dos grânulos (JACOBS; DELCOUR, 1998; JAYAKODY; HOOVER, 2008). Este tratamento vem sendo utilizado para promover um melhor entendimento sobre a estrutura granular de amidos.

A modificação ácida dos amidos também pode ser bastante útil para o entendimento da estrutura cristalina dos amidos. Hidrólises ácidas por períodos prolongados são comumente realizadas com ácido clorídrico ou com ácido sulfúrico que vão formar amilodextrinas conhecidas como Lintner ou Naegeli, respectivamente (HOOVER, 2000). Ambas as amilodextrinas mantém intacta a estrutura cristalina que consiste de regiões ácido-resistentes da amilopectina. O denso empacotamento das cadeias dos amidos nas lamelas cristalinas não permite a penetração do íon de hidrogênio e as ligações glicosídicas ficam protegidas no interior das duplas hélices (NAKAZAWA; WANG, 2003).

Sendo o ‘annealing’ um tratamento que promove maior perfeição dos cristais devido à otimização do empacotamento das duplas hélices, seria plausível que o tratamento hidrotérmico resultasse em maior resistência dos amidos à hidrólise ácida. No entanto, o efeito do ‘annealing’ na suscetibilidade dos grânulos de amido ao ácido é controverso e dependente principalmente da fonte botânica dos amidos. Alguns autores observaram redução na porcentagem de hidrólise de amidos de inhame (JAYAKODY et al., 2009), amidos de batata e trigo (HOOVER; VASANTHAN, 1994) e amidos de batata (JACOBS et al., 1998a), enquanto nenhuma diferença na suscetibilidade ácida de amidos de trigo e ervilha após ‘annealing’ foi observada (JACOBS et al., 1998a). Estes dados sugerem que o rearranjo

molecular ocorrido durante o tratamento hidrotérmico é fortemente dependente da estrutura do amido estudado. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a ação do ácido clorídrico sobre as características estruturais de amidos de milho normal, milho ceroso, mandioquinha-salsa, mandioca e batata e verificar a influência do ‘annealing’ na hidrólise ácida destes amidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amidos de milho normal, milho ceroso, mandioquinha-salsa, mandioca e batata nativos, previamente isolados em laboratório como descrito por Rocha, Jane e Franco (s.d.) (capítulo 2) foram utilizados. A enzima isoamilase de *Pseudomonas* sp. (Megazyme International, Irlanda) foi usada. Todos os reagentes foram puros para análise.

2.2. Métodos

2.2.1. ‘Annealing’ dos amidos

Os amidos foram submetidos ao ‘annealing’ durante 24 horas, a 3 °C abaixo da temperatura inicial de gelatinização de cada amido (63 °C, 62 °C, 54 °C, 56 °C e 59 °C para os amidos de milho normal, milho ceroso, mandioquinha-salsa, mandioca e batata, respectivamente) de acordo com procedimento de Rocha et al. (2010a) (capítulo 3).

2.2.2. Hidrólise ácida

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ foram hidrolisados seguindo procedimento descrito por Jacobs et al. (1998c), com modificações. Porções de 20 g (b.s.) dos amidos, foram suspensas em 2,2 M HCl (5% p/v) e incubados a 35 °C por até 21 dias, sendo gentilmente agitadas a cada 24 horas. Alíquotas do sobrenadante (10 mL) foram retiradas diariamente, centrifugadas (2000 g, 15 min) e os carboidratos solubilizados foram determinados pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A extensão da hidrólise foi determinada através da razão entre a quantidade de carboidratos totais solubilizados e o

peso total de amido. Após 3, 9 e 18 dias, os resíduos insolúveis foram recuperados por centrifugação a 3600 g por 20 min. Os resíduos da hidrólise foram por duas vezes suspensos em 100 mL de água destilada, neutralizados com 0,2 M NaOH e centrifugados a 3600 g por 20 min. Então, foram suspensos em 100 mL de etanol absoluto, centrifugados (3600 g, 20 min), suspensos em acetona e secos em estufa com circulação forçada de ar a 32 °C, por 12 horas.

2.2.3. Morfologia dos grânulos de amidos nativos e tratados por ácido

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’, antes e após hidrólise ácida, foram desidratados com etanol, aplicados sobre fita adesiva de carbono dupla face que estava aderida a um disco metálico. As amostras receberam uma aplicação de uma camada de 20 nm de ouro e foram então observadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operando a uma aceleração de voltagem de 10 a 20 kV. Imagens foram obtidas com aumento de 1.000 para o amido de batata e 2.000 vezes para os demais amidos.

2.2.4. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina através de cromatografia de troca aniônica de alta eficiência

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’, antes e após hidrólise ácida, foram desramificados com isoamilase de acordo com procedimento descrito por Wong e Jane (1995). A distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos foi avaliada num sistema HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40 conforme descrito por Rocha, Hammond e Franco (s.d.) (capítulo 5). Amostras dos resíduos da hidrólise ácida também foram preparadas sem a etapa de desramificação por isoamilase e tiveram a distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina avaliadas como descrito anteriormente. As amostras foram analisadas em duplicata.

2.2.5. Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade

As umidades das amostras foram equilibradas em dissecador contendo solução de

BaCl₂ saturada (25 °C, a_w= 0.9) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X dos amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’, antes e após hidrólise ácida, foram determinados utilizando-se uma unidade RINT2000 Wide Angle Goniometer, com radiação de Cu, linha K, $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$. A velocidade de varredura foi de 1° por minuto e as condições de uso foram de 50Kv e 100 mA. A porcentagem de cristalinidade foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e a área total seguindo método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA). Os gráficos foram suavizados utilizando o método ‘Adjacent Averaging’. As análises foram realizadas em triplicata.

2.2.6. Teor de amilose aparente

As amostras antes e após hidrólise ácida foram previamente desgorduradas por dispersão em DMSO 90% conforme descrito por Franco et al. (2002). A afinidade por iodo das amostras desgorduradas foi determinada em um titulador potenciométrico automático (716 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland) conforme descrito por Kasemsuwam et al. (1995). O teor de amilose aparente foi calculado pela divisão das afinidades por iodo dos amidos desgordurados por 20% (TAKEDA; HIZUKURI, 1987). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.7. Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos antes e após hidrólise ácida foram determinadas através de calorímetro diferencial de varredura de acordo com método descrito por Franco et al. (2002). A taxa de aquecimento empregada foi de 5 °C/min. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.8. Análise estatística

O delineamento experimental adotado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por duas ou três repetições. O programa Statistica for Windows (v. 5.0, Statsoft, Tulsa, OK) foi utilizado abrangendo a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética de hidrólise ácida

Os perfis de hidrólise ácida dos amidos das diferentes fontes botânicas, nativos e submetidos ao ‘annealing’ estão apresentados na Figura 1. Duas fases puderam ser claramente observadas para todos os amidos durante a hidrólise ácida. A primeira fase, representada em média pelos primeiros 12 dias de hidrólise, pode ser atribuída à rápida hidrólise das regiões amorfas dos grânulos. Já a segunda fase, mais lenta, pode ser atribuída à hidrólise das lamelas cristalinas (JACOBS et al., 1998a; SRICHUWONG et al., 2005a; WADUGE et al., 2006).

Houve um progressivo aumento na porcentagem de hidrólise dos amidos, independentemente do ‘annealing’, durante a primeira fase da hidrólise após o que, a velocidade de reação caiu e manteve praticamente constante.

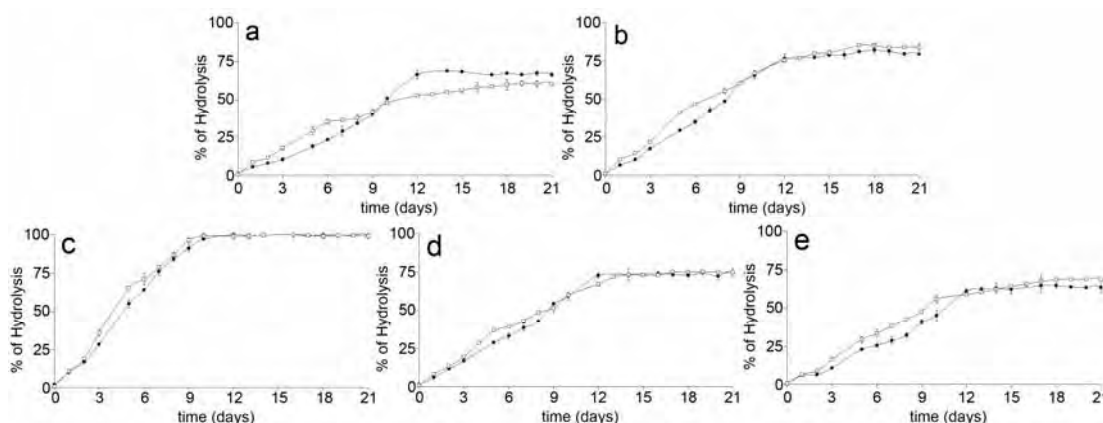


Figura 1. Perfil de hidrólise ácida dos amidos, antes (●) e após (□) ‘annealing’. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioquinha-salsa; (d) mandioca; (e) batata.

O amido de mandioquinha-salsa foi o mais suscetível à hidrólise ácida, sendo que a primeira fase de hidrólise deste amido compreendeu cerca de 9 dias, ao contrário dos outros amidos que mostraram em média 12 dias. Este amido apresentou praticamente 99% de hidrólise ao final de 21 dias, seguido dos amidos de milho ceroso, mandioca e milho normal que apresentaram 77, 75, e 68% de hidrólise, respectivamente. O amido de batata foi o mais resistente e apresentou 61% de hidrólise após 21 dias de tratamento. Em trabalho anterior de Rocha, Jane e Franco (s.d.) (capítulo 2) foi observado que os amidos de milho normal, milho ceroso apresentaram padrão de difração de raios-X tipo A, os amidos de mandioquinha-salsa e

batata apresentaram padrão de difração de raios-X tipo B, enquanto que o amido de mandioca apresentou padrão tipo C_A. Srichuwong et al. (2005a) e Jane (2006) sugeriram que amidos tipo A são mais facilmente digeridos pelo ácido do que amidos tipo B, porque nos primeiros, as ligações ramificadas da amilopectina estão mais dispersas. Isto pode ser resultado da grande proporção de cadeias curtas presentes nestes amidos (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997). Estas ligações ramificadas estão dispersas nas regiões amorfas e cristalinas, entretanto, as que estão nas regiões amorfas são mais suscetíveis à hidrólise ácida e produzem mais rapidamente cadeias lineares, enquanto que aquelas que estão nas regiões cristalinas estão protegidas e assim, as cadeias permanecem ramificadas.

A maior suscetibilidade à ação do ácido apresentada pelo amido de mandioquinha-salsa, apesar de este apresentar padrão cristalino tipo B, pode ser devido a uma estrutura cristalina frágil, conforme sugerido por Rocha et al. (2010a) (capítulo 3), e portanto, mais suscetível à hidrólise ácida.

O ‘annealing’ modificou o comportamento de todos os amidos frente ao ácido tornando-os mais suscetíveis na primeira fase de hidrólise. O amido de milho normal apresentou maior resistência à hidrólise durante a segunda fase, enquanto que para os demais amidos a suscetibilidade nesta segunda fase permaneceu inalterada após o tratamento hidrotérmico.

Aumento na suscetibilidade ácida durante a primeira fase da hidrólise e a não alteração da degradação dos grânulos na segunda fase também foram observados por Tester, Debon e Karkalas (1998), estudando amido de trigo e por Lan et al. (2008) para amidos de trigo normal, trigo ceroso e trigo com alto teor de amilose. Em estudos anteriores Rocha et al. (2010a) (capítulo 3) e Rocha et al. (2010b) (capítulo 4) foi observado que o ‘annealing’ promoveu a formação de novas interações entre as cadeias de amilopectina, o que pode ter exposto às cadeias de amilose à ação enzimática. O aumento na suscetibilidade ácida dos amidos submetidos ao ‘annealing’ e ao ácido na primeira etapa da hidrólise reforçam a possibilidade de maior exposição das regiões amorfas do grânulo em função do rearranjo molecular e aumento da ordem cristalina provocado pelo tratamento hidrotérmico.

Na segunda fase de hidrólise, era esperado que a melhor organização das regiões cristalinas, decorrentes da discreta reorganização molecular dos amidos ocorrida com o tratamento hidrotérmico, pudesse ter provocado, de um modo geral, maior resistência dos grânulos dos amidos à ação do ácido (JACOBS et al., 1998a), que só ocorreu para o amido de milho normal. A degradação das regiões cristalinas ocorre de forma mais lenta devido ao

denso empacotamento que impede a mudanças da conformação das unidades D-glucopiranosil de “cadeira” para “meia-cadeira”, necessária para que ocorra a hidrólise ácida (HOOVER, 2000). Desta forma, a maior resistência do amido de milho normal submetido ao ‘annealing’, na segunda fase de hidrólise, pode ser devido a um melhor empacotamento das regiões cristalinas causando um impedimento estérico para a reação hidrolítica ocorrer.

Apesar dos amidos de milho ceroso, mandioquinha-salsa e batata terem apresentado aumento da porcentagem de cristalinidade após o tratamento hidrotérmico (ROCHA et al., 2010a (capítulo 3); ROCHA et al., 2010b (capítulo 4)), é possível que, ainda assim, o ácido tenha penetrado na região cristalina e hidrolisado os amidos da mesma forma que hidrolisou os amidos nativos.

3.2. Morfologia dos grânulos de amido

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ e os resíduos obtidos após 3, 9 e 18 dias de hidrólise ácida foram observados em microscópio eletrônico de varredura e as imagens estão apresentadas nas Figuras 2 a 6. Os amidos de milho normal e milho ceroso nativos mostraram grânulos com formatos circulares e poliédricos e superfícies porosas e com depressões (Figuras 2a e 3a, respectivamente).

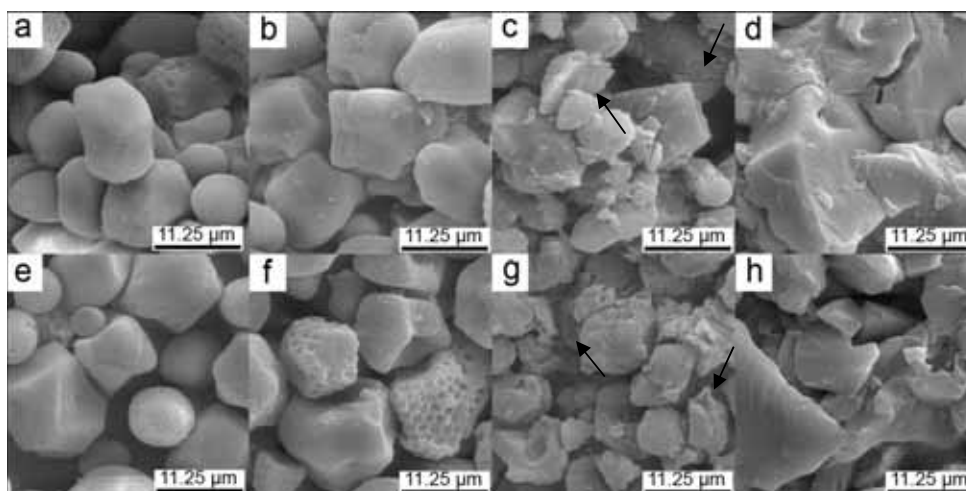


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido milho normal. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias.

O tratamento hidrotérmico não alterou o formato dos grânulos, mas a superfície de

ambos os amidos apresentou maior quantidade de poros que também se mostraram com tamanhos maiores, principalmente para o amido de milho normal (Figuras 2f e 3f) concordando com observações anteriores de Rocha et al. (2010b) (capítulo 4). Os grânulos de amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata nativos apresentaram formas e tamanhos típicos com superfícies predominantemente lisas (Figuras 4a, 5a e 6a, respectivamente). Após ‘annealing’, o formato granular dos amidos foi mantido, no entanto o amido de mandioca apresentou fissuras na superfície de alguns grânulos (Figura 5e ↓), como apresentado em trabalho anterior de Rocha et al. (2010a) (capítulo 3).

O ácido atacou os grânulos dos amidos por exocorrosão. Após 3 dias de tratamento ácido foi possível observar superfícies granulares levemente corroídas, porém o formato granular foi preservado para os amidos de milho normal, milho ceroso, mandioca e batata (Figuras 2b, 3b, 5b e 6b, respectivamente). O amido de mandioquinha-salsa após 3 dias de hidrólise já exibia grânulos com formatos bastante irregulares, extremidades pontiagudas e formação de aglomerados (Figura 4b), provavelmente devido à alta taxa de hidrólise apresentada por este amido (Figura 1).

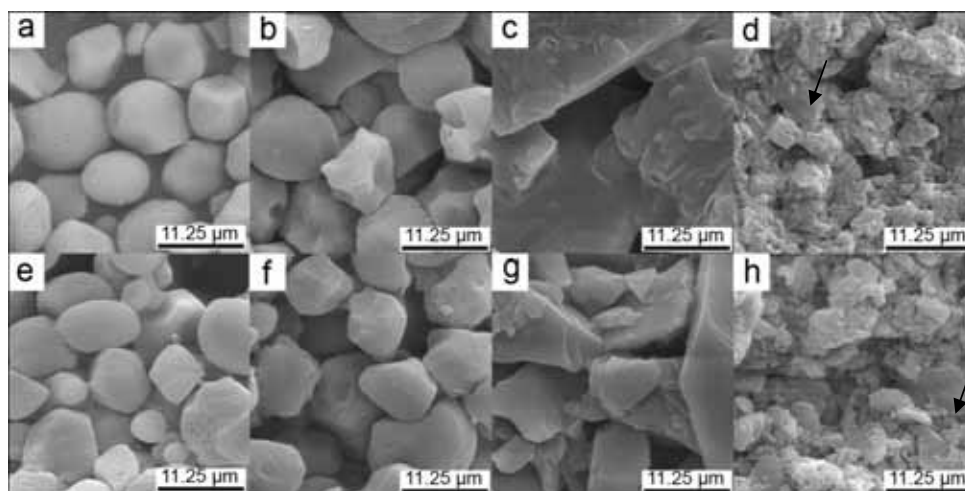


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido milho ceroso. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias.

Com o decorrer da hidrólise foi possível observar claramente que os grânulos dos amidos de milho ceroso, mandioquinha-salsa e mandioca eram corroídos mais rapidamente que os de amido de milho normal e batata, confirmando os resultados apresentados na Figura 1. Após 9 dias de hidrólise os grânulos dos amidos de milho normal e batata mostravam-se

quebradiços e corroídos com algumas extremidades pontiagudas, que indicavam a formação de material mais cristalino (Figura 2c e 6c ↓), enquanto os grânulos dos amidos de milho ceroso, mandioquinha-salsa e mandioca já mostravam estruturas maiores, com formatos poligonais, superfícies facetadas e extremidades pontiagudas, característico de material cristalino (Figuras 3c, 4c e 5c).

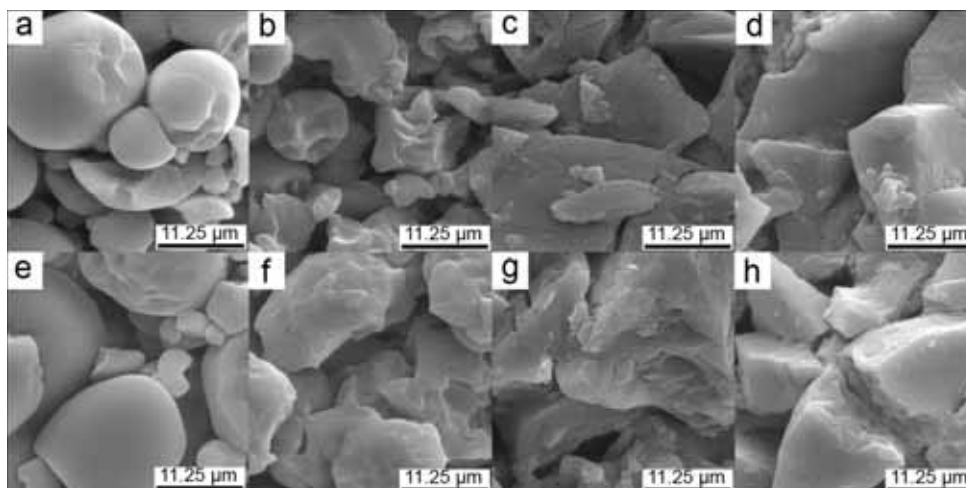


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias.

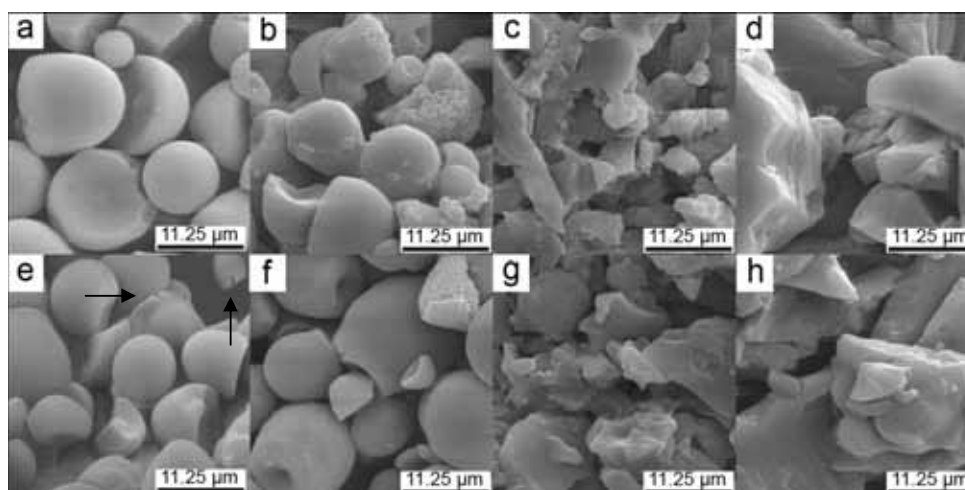


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido mandioca. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias.

Estas estruturas, provenientes da aglomeração das regiões cristalinas remanescentes da hidrólise ácida dos grânulos de amido, foram observadas com 18 dias de hidrólise para os amidos de milho normal e batata (Figuras 2c e 6c). Neste tempo, o material cristalino dos grânulos de amido de milho ceroso havia se tornado quebradiço, porém alguns fragmentos ainda apresentavam extremidades pontiagudas (Figura 3d ↓). Os resíduos cristalinos do amido de mandioquinha-salsa, que atingiu 99% de hidrólise após 9 dias de reação, ainda resistia à ação do ácido após 18 dias de reação.

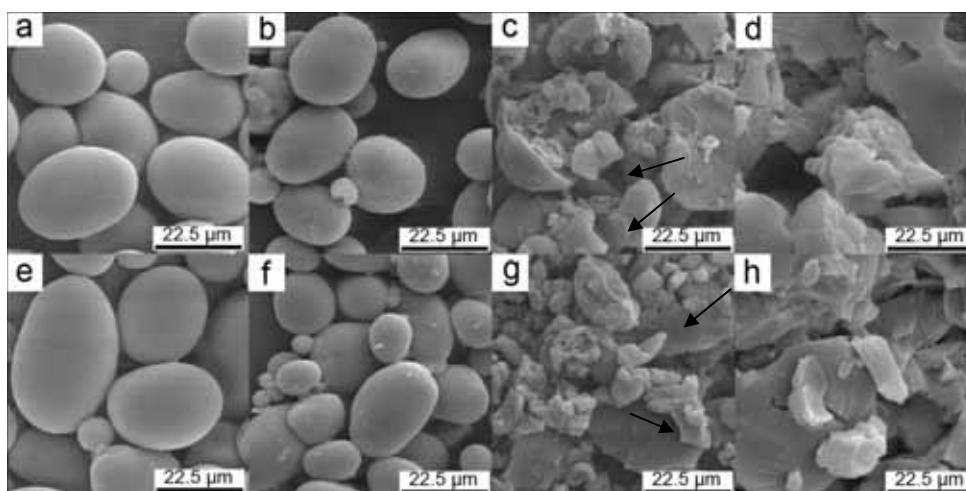


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido batata. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias, (b) 3 dias, (c) 9 dias, (d) 18 dias; Após ‘annealing’: (e) 0 dias, (f) 3 dias, (g) 9 dias, (h) 18 dias.

Apesar do estudo da cinética de hidrólise ácida ter mostrado que o ‘annealing’ tornou os amidos mais suscetíveis ao ácido durante a primeira fase de hidrólise, onde o material amorfo foi principalmente atacado, e mais resistente durante a segunda fase para o amido de milho normal (Figura 1), para todos os amidos não foi possível visualizar diferenças na degradação dos amidos antes e após ‘annealing’ através da morfologia dos grânulos.

3.3. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina

As distribuições dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos após os diferentes tempos de hidrólise ácida foram avaliadas. Todos os amidos nativos apresentaram distribuição com duas populações de cadeias formando dois picos distintos, o primeiro com DP de 11 a 14 e o segundo com DP de 42 a 48. Os amidos de mandioquinha-

salsa e mandioca nativos e submetidos ao ‘annealing’ apresentaram ombros na distribuição entre DP 18-24. Esse ombro é indicativo de que cadeias com DP < 10, que não são capazes de formar duplas hélices, estão localizadas na região cristalina formando defeitos na estrutura granular (JANE et al., 1999; GENKINA et al., 2007). Nenhum ombro foi visualizado para os demais amidos. O ‘annealing’ não alterou o perfil de distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos, como já sido observado por Rocha et al. (2010a) (capítulo 3) e Rocha et al. (2010b) (capítulo 4).

Tabela 1. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de milho normal antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0 dias	0,65 ^d	26,54 ^{de}	51,25 ^c	12,12 ^a	9,44 ^a	19,46 ^a
3 dias	6,81 ^b	30,40 ^b	49,41 ^d	8,66 ^b	4,72 ^c	16,37 ^c
9 dias	7,13 ^b	27,97 ^{cd}	53,27 ^b	7,29 ^c	4,35 ^c	16,18 ^c
18 dias	3,15 ^c	28,15 ^c	55,06 ^a	7,82 ^{bc}	5,81 ^b	16,86 ^b
Após ‘annealing’						
0 dias	0,36 ^d	26,11 ^e	50,94 ^c	12,70 ^a	9,89 ^a	19,77 ^a
3 dias	8,38 ^a	31,48 ^a	50,43 ^{cd}	7,76 ^{bc}	1,95 ^d	15,09 ^d
9 dias	6,96 ^b	26,97 ^d	52,95 ^b	7,92 ^{bc}	5,20 ^b	16,62 ^{bc}
18 dias	3,86 ^c	27,48 ^d	54,86 ^a	8,02 ^{bc}	5,77 ^b	17,02 ^b

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A ação do ácido clorídrico sobre todos os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ provocou um estreitamento do primeiro pico e degradação do segundo pico da distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina (Figuras 7 a 11) com o tempo de reação. Como a hidrólise ácida ataca preferencialmente as regiões amorfas dos grânulos de amido (JACOBS et al., 1998), estes resultados indicam um aumento na cristalinidade dos amidos com o aumento no tempo de hidrólise e maior degradação das cadeias longas da amilopectina, em função da ação do ácido. Observações semelhantes foram feitas por Jane, Wong e McPherson, (1997) para amidos de batata e por Campanha (2010) para amidos de mandioca, batata-doce, mandioquinha-salsa e batata, submetidos à hidrólise com ácido sulfúrico.

A amilopectina do amido de milho normal nativo apresentou aumento na proporção de cadeias curtas (DP 2-12), aumento na proporção de cadeias com DP 13-24 e diminuição na proporção de cadeias muito longas (DP ≥ 37) até 9 dias de hidrólise ácida (Tabela 1).

Segundo Genkina et al. (2007), cadeias com DP 13-24 apresentam o tamanho ideal para formarem duplas hélices mais perfeitas promovendo um denso empacotamento da região cristalina. Desta forma, é possível que a penetração dos íons de hidrogênio seja dificultada, já que é necessária uma mudança na conformação da unidade D-glucopiranosil de “cadeira” para “meia cadeira” para ocorrer a ação hidrolítica (HOOVER, 2000), e o denso empacotamento causaria um impedimento estérico à hidrólise destas cadeias. Com 18 dias de reação, a proporção de cadeias longas aumentou ligeiramente, sugerindo que, as cadeias mais longas estavam localizadas mais internamente nos cristais e foram mais resistentes à ação do ácido. O DP médio da amilopectina reduziu a partir de 3 dias de tratamento ácido e manteve-se constante nos tempos seguintes, mesmo com o aumento na proporção de cadeias muito longas com 18 dias de hidrólise ácida.

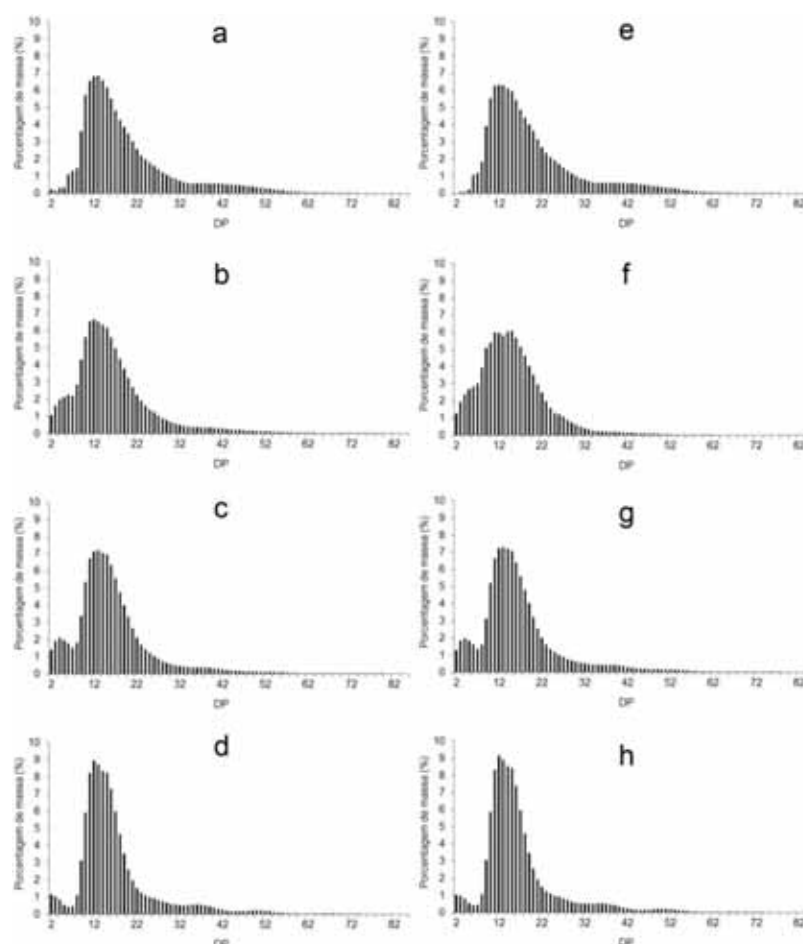


Figura 7. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de milho normal submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias.

O tratamento hidrotérmico não provocou alteração no perfil de distribuição das cadeias da amilopectina, sugerindo que o ácido degradou a amilopectina deste amido da mesma forma que degradou para o amido nativo.

Tabela 2. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de milho ceroso antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0 dias	0,46 ^e	25,53 ^e	49,13 ^c	14,44 ^a	10,44 ^a	20,24 ^a
3 dias	9,08 ^c	30,23 ^c	50,72 ^b	8,16 ^b	1,81 ^b	15,11 ^b
9 dias	12,10 ^b	39,74 ^b	47,08 ^d	1,07 ^c	0,02 ^c	12,04 ^d
18 dias	6,16 ^d	52,71 ^a	40,08 ^f	0,68 ^d	0,38 ^c	12,02 ^d
Após ‘annealing’						
0 dias	0,28 ^e	25,16 ^e	49,43 ^c	14,67 ^a	10,46 ^a	20,33 ^a
3 dias	9,67 ^c	27,70 ^d	42,46 ^c	9,23 ^b	1,94 ^b	15,29 ^d
9 dias	14,07 ^a	29,41 ^c	54,54 ^a	1,93 ^c	0,05 ^c	13,21 ^c
18 dias	5,55 ^d	52,25 ^a	41,13 ^e	0,81 ^d	0,27 ^c	12,07 ^d

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

O amido de milho ceroso apresentou completa degradação do segundo pico da distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina com 9 dias de hidrólise. Diferente do amido de milho normal, a amilopectina deste amido apresentou quantidade expressiva de cadeias curtas em 18 dias de hidrólise ácida, mostrando uma degradação intensiva das moléculas de amilopectina deste amido pelo ácido (Tabela 2).

Após o ‘annealing’ também foi observado completa degradação do segundo pico com 9 dias de hidrólise ácida. A proporção de cadeias muito curtas (DP 2-5) aumentou com 3 e 9 dias de tratamento ácido e a proporção de cadeias com DP 6-12 foi menor que aquela do amido nativo. Estes resultados sugerem que cadeias laterais curtas, que provavelmente ficaram localizadas na superfície dos cristais após a reorganização estrutural provocada pelo ‘annealing’, passaram a ser preferencialmente hidrolisadas pelo ácido, o que provocou aumento na suscetibilidade deste amido durante este período. No entanto, a proporção de cadeias com DP 13-24 foi maior a partir de 9 dias de hidrólise, comparado ao amido nativo, sugerindo que neste momento, a melhor organização estrutural causada pelo tratamento hidrotérmico, resultou em maior resistência dessas cadeias, sugerindo um efeito protetor

causado pelo ‘annealing’ sobre essas cadeias da amilopectina. Com o prolongamento do tempo de hidrólise essas cadeias foram atacadas e ao final de 18 dias de tratamento ácido, a distribuição do comprimento das cadeias da amilopectina foi similar à observada para o amido nativo.

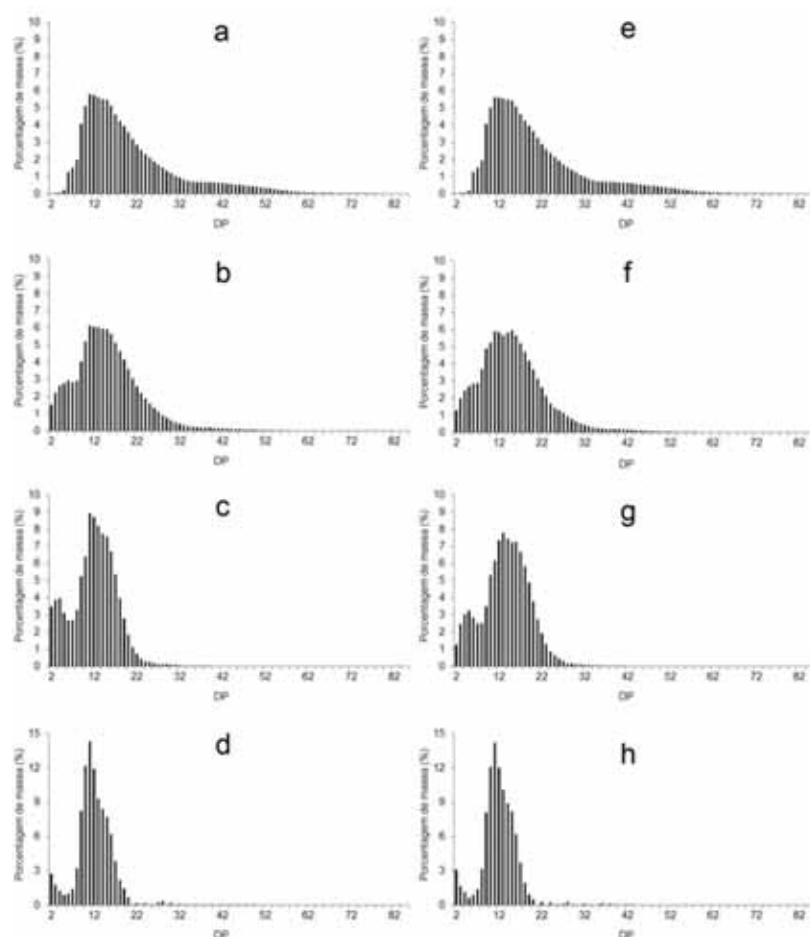


Figura 8. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de milho ceroso submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias.

A proporção de cadeias muito curtas (DP 2-5) do amido de mandioquinha-salsa nativo aumentou com 3 dias de hidrólise (Figura 9b). Essas cadeias podem ser provenientes da ação hidrolítica do ácido nas cadeias curtas (DP < 10) que formam defeitos na estrutura do amido, evidenciado pelo ombro na distribuição (JANE, 2006). De fato, o ombro observado na distribuição das cadeias da amilopectina do amido nativo desapareceu a partir de 3 dias de

hidrólise (Figura 9). Estas cadeias muito curtas podem ainda ser provenientes da hidrólise de cadeias mais longas presentes na superfície das regiões cristalinas. Com o prolongamento do tempo de hidrólise, a proporção dessas cadeias muito curtas (DP 2-5) diminuiu.

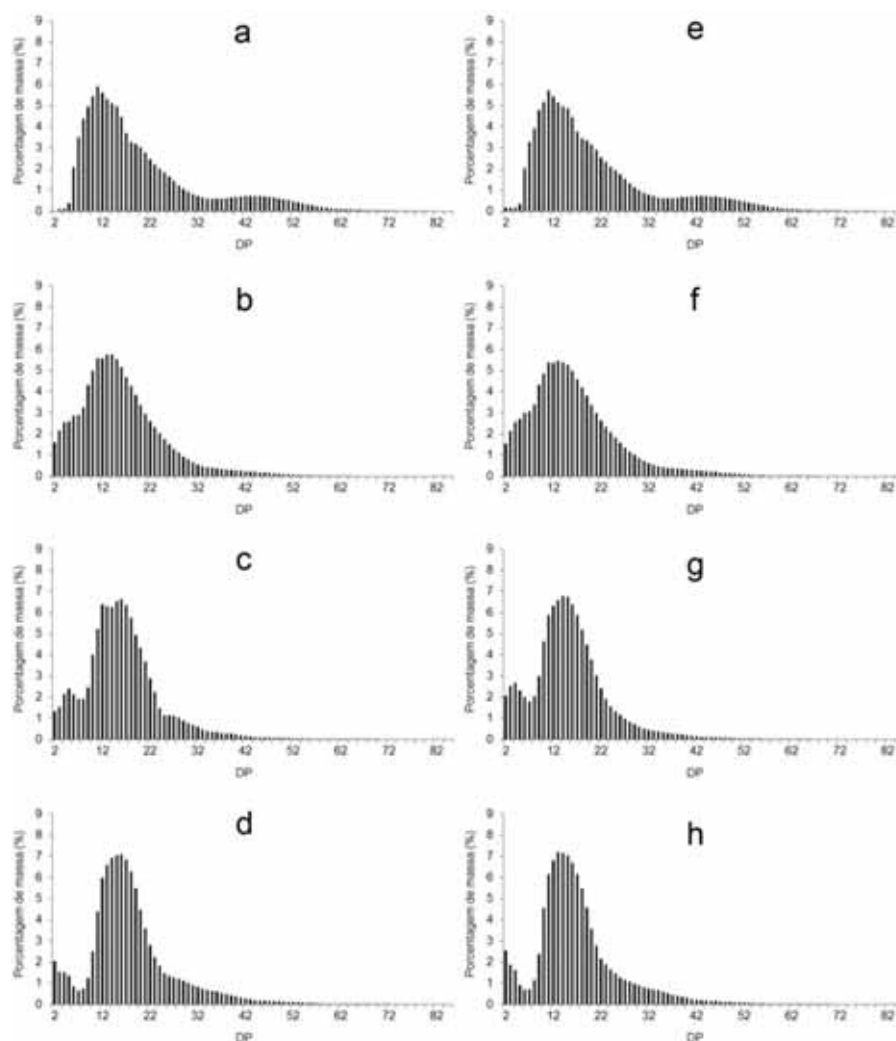


Figura 9. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioca-salsa submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias.

A proporção de cadeias com DP 13-24 aumentou para o amido de mandioca-salsa nativo em função do tempo de hidrólise, sugerindo que a penetração dos íons de hidrogênio foi dificultada devido ao denso empacotamento destas cadeias que causaria um impedimento

estérico à hidrólise. A proporção de cadeias muito longas ($DP \geq 37$) e o DP médio das cadeias da amilopectina deste amido diminuíram progressivamente até 9 dias de hidrólise. Com 18 dias de reação, a proporção de cadeias muito longas e o DP médio aumentaram (Tabela 3). Aumento na proporção de cadeias muito longas e no DP médio de amido de mandioquinha-salsa também foi observado por Campanha (2010) quando este amido foi submetido à hidrólise por ácido sulfúrico. Esses resultados sugerem que para este amido as cadeias longas da amilopectina estavam localizadas mais internamente nos grânulos e foram protegidas do ataque ácido.

Tabela 3. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do amido de mandioquinha-salsa, antes e após ‘annealing’, submetidos à hidrólise ácida.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0 dias	0,43 ^e	29,82 ^{ab}	42,64 ^f	13,31 ^a	13,80 ^a	20,76 ^a
3 dias	8,53 ^c	28,70 ^b	48,45 ^e	10,70 ^c	3,62 ^c	15,93 ^c
9 dias	7,92 ^c	26,06 ^d	55,04 ^c	8,59 ^d	2,40 ^d	15,85 ^c
18 dias	5,83 ^d	19,41 ^f	59,18 ^a	11,36 ^b	4,22 ^b	17,57 ^b
Após ‘annealing’						
0 dias	0,64 ^e	31,25 ^a	42,77 ^f	12,30 ^a	13,04 ^a	20,26 ^a
3 dias	9,05 ^b	27,60 ^c	48,40 ^e	10,89 ^{bc}	4,15 ^b	16,65 ^{bc}
9 dias	10,67 ^a	25,74 ^d	53,74 ^d	7,80 ^d	2,03 ^d	15,24 ^c
18 dias	5,25 ^d	21,99 ^e	58,48 ^b	10,71 ^c	3,57 ^c	16,85 ^{bc}

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O amido de mandioquinha-salsa submetido ao ‘annealing’, apresentou maior proporção de cadeias muito curtas (DP 2-5) (Tabela 3) do que o amido nativo, com 3 e 9 dias de hidrólise. Esses resultados sugerem que o rearranjo estrutural provocado pelo tratamento hidrotérmico pode ter provocado uma maior exposição das cadeias com $DP < 10$ que resultavam em defeitos na estrutura cristalina tornando-as mais suscetíveis à ação do ácido. A proporção dos outros comprimentos de cadeias laterais da amilopectina após ‘annealing’ não sofreu alterações significativas durante a hidrólise ácida em relação ao amido nativo.

Tabela 4. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas das amilopectinas do

amido de mandioca antes e após 'annealing', submetidos à hidrólise ácida.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0 dias	1,59 ^c	30,92 ^a	44,17 ^e	12,18 ^a	11,14 ^a	19,56 ^a
3 dias	6,63 ^b	30,98 ^a	47,60 ^c	9,99 ^b	4,80 ^b	16,56 ^b
9 dias	7,42 ^b	28,69 ^b	53,73 ^a	7,82 ^d	2,34 ^d	15,53 ^c
18 dias	7,44 ^b	28,35 ^{bc}	54,05 ^a	7,78 ^d	2,38 ^d	15,55 ^c
Após ‘annealing’						
0 dias	0,55 ^d	29,28 ^{ab}	46,25 ^d	12,78 ^a	11,13 ^a	19,94 ^a
3 dias	6,63 ^b	30,89 ^a	47,58 ^c	10,08 ^b	4,81 ^b	16,58 ^b
9 dias	8,56 ^a	27,86 ^c	52,05 ^b	8,56 ^c	2,96 ^d	15,78 ^{bc}
18 dias	6,93 ^b	29,06 ^{ab}	52,19 ^b	8,37 ^c	3,46 ^c	15,89 ^{bc}

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 5. Distribuição dos comprimentos de cadeias desramificadas das amilopectinas dos amidos de batata antes e após 'annealing', submetidos à hidrólise ácida.

Amidos	Distribuição (%)					DP médio
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP > 37	
Antes do ‘annealing’						
0 dias	0,47 ^d	23,20 ^a	51,75 ^a	13,04 ^a	11,54 ^a	20,65 ^a
3 dias	6,98 ^{ab}	23,80 ^a	49,81 ^c	13,03 ^a	6,38 ^b	18,03 ^b
9 dias	7,15 ^a	19,06 ^d	59,29 ^b	11,79 ^b	2,71 ^c	17,16 ^{bc}
18 dias	5,39 ^c	21,99 ^{bc}	62,65 ^a	8,66 ^c	1,31 ^d	16,29 ^c
Após ‘annealing’						
0 dias	0,35 ^d	22,82 ^a	51,02 ^a	13,98 ^a	11,82 ^a	20,88 ^a
3 dias	6,73 ^b	22,84 ^a	49,71 ^c	13,80 ^a	6,92 ^b	18,43 ^b
9 dias	7,15 ^a	21,09 ^c	58,27 ^b	11,00 ^b	2,50 ^c	16,84 ^c
18 dias	5,66 ^c	20,70 ^c	63,09 ^a	9,14 ^c	1,41 ^d	16,45 ^c

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

O amido de mandioca nativo também apresentou aumento na proporção de cadeias muito curtas (DP 2-5) provavelmente devido à ação do ácido sobre as cadeias curtas (DP < 10) que não são capazes de formar duplas hélices e formam defeitos na estrutura cristalina dos grânulos. A degradação dessas cadeias curtas foi evidenciada pelo desaparecimento do ombro no perfil de distribuição das cadeias da amilopectina deste amido com 3 dias de hidrólise (Figura 10). Como observado para o amido de mandioquinha-salsa, a proporção de cadeias

com DP 13-24 do amido de mandioca nativo também aumentou com o tempo de hidrólise e o empacotamento dessas cadeias pode causar um impedimento estérico à ação hidrolítica do ácido clorídrico. Degradação progressiva das cadeias muito longas ($DP \geq 37$) da amilopectina deste amido também foi observada.

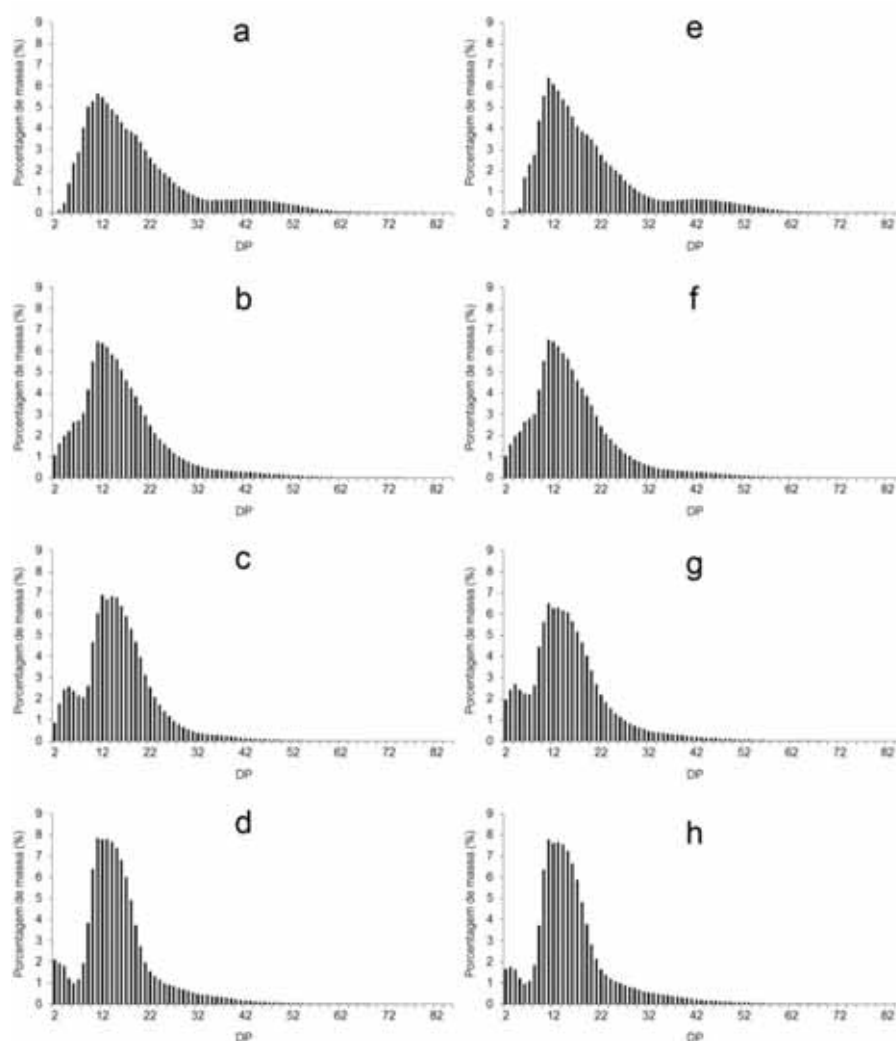


Figura 10. Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias.

Após ‘annealing’, a amilopectina do amido de mandioca também apresentou maior proporção de cadeias muito curtas (DP 2-5), porém apenas com 9 dias de hidrólise, provavelmente devido a uma maior exposição destas cadeias causada pelo tratamento

hidrotérmico. A proporção de cadeias com DP 13-24 da amilopectina deste amido durante os diferentes tempos de hidrólise foi ligeiramente menor do que a observada para o amido nativo, sugerindo uma maior acessibilidade do ácido à essas cadeias após o tratamento hidrotérmico. Um ligeiro aumento na proporção de cadeias muito longas do amido de mandioca submetido ao ‘annealing’ também pode ser notado, no entanto, este aumento não foi suficiente para aumentar o DP médio das cadeias de sua amilopectina.

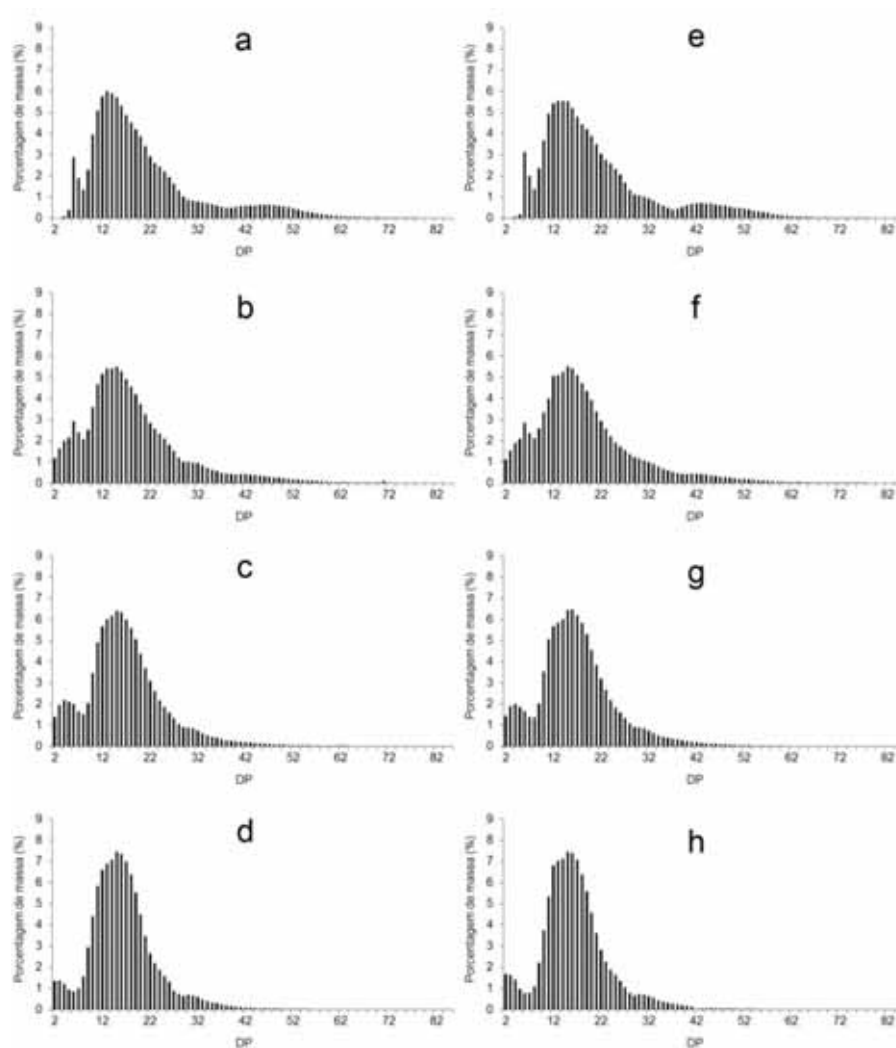


Figura 11. Distribuição dos comprimentos de cadeias desramificadas da amilopectina dos amidos de batata submetidos à hidrólise ácida. Antes do ‘annealing’: (a) 0 dias; (b) 3 dias; (c) 9 dias; (d) 18 dias. Após ‘annealing’: (e) 0 dias; (f) 3 dias; (g) 9 dias; (h) 18 dias.

O amido de batata nativo também apresentou aumento na proporção de cadeias muito curtas (DP 2-5) com o tempo de hidrólise. No entanto, estas cadeias podem ser provenientes da hidrólise de cadeias mais longas presentes na superfície das regiões cristalinas, já que este amido não apresentou ombros no perfil de distribuição das cadeias de sua amilopectina. Da mesma forma que observado para os outros amidos, a proporção de cadeias com DP 13-24 aumentou e a proporção de cadeias muito longas ($DP \geq 37$) diminuiu.

A distribuição do comprimento das cadeias da amilopectina do amido de batata submetido ao ‘annealing’ não foi significativamente alterado em relação ao amido nativo nos diferentes tempos de hidrólise (Figura 11).

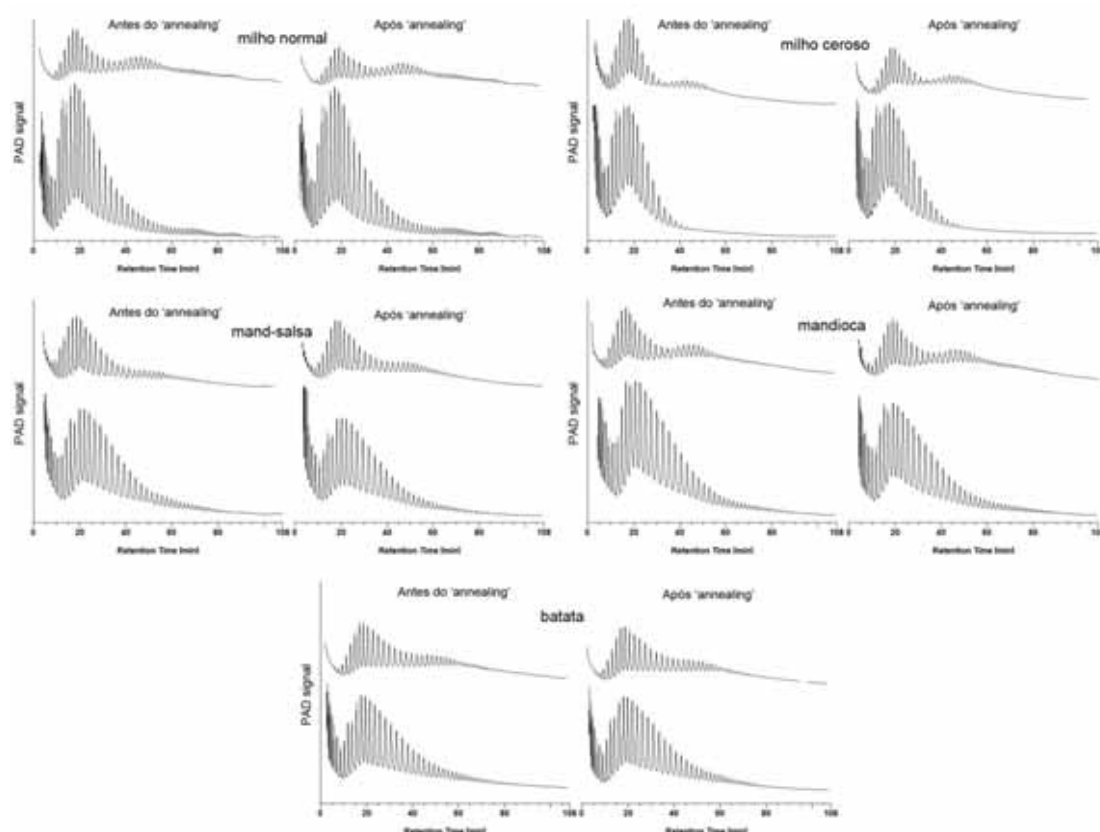


Figura 12. Cromatogramas de HPAEC-PAD dos amidos submetidos à hidrólise ácida obtidos após 9 dias de hidrólise, sem desramificar (gráficos superiores) e desramificados por isoamilase (gráficos inferiores).

A Figura 12 apresenta os cromatogramas de HPAEC-PAD das amilopectinas dos amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ hidrolisados por ácido durante 9 dias, antes e após a etapa de desramificação das cadeias pela enzima isoamilase. Os cromatogramas das

amilopectinas que não passaram pela etapa de desramificação exibiram dois picos em que, segundo Jane, Wong e McPherson (1997), o primeiro pico corresponde à população de cadeias lineares e o segundo pico corresponde à população de cadeias com uma única ramificação.

O segundo pico foi mais evidente para os amidos de milho normal, milho ceroso e mandioca. Estes amidos também apresentaram maiores valores de razão entre as áreas do pico de cadeias uni-ramificadas para as áreas do pico de cadeias lineares (R) (Tabela 6) do que os demais amidos. Segundo Jane, Wong e McPherson (1997), amidos com padrão cristalino tipo A, ou C_A como no caso do amido de mandioca, possuem pontos de ramificação tanto nas lamelas amorfas quanto nas lamelas cristalinas, devido à alta proporção de cadeias curtas presentes nestes amidos, e os pontos de ramificações das lamelas cristalinas estariam protegidos do ataque do ácido. Já para amidos tipo B, a maioria dos pontos de ramificação está presente nas lamelas amorfas, que são mais suscetíveis à hidrólise ácida. O segundo pico mais discreto apresentado para os amidos de batata e mandioquinha-salsa (tipo B) pode ser explicado pela menor quantidade de pontos de ramificação presente nas lamelas cristalinas destes amidos.

Após desramificação com isoamilase, este segundo pico desapareceu para todos os amidos (Figura 12, gráficos inferiores), comprovando que a segunda população era composta por cadeias uni-ramificadas cuja ligação α -(1→6) estava localizada na lamela cristalina e ficou protegida durante a hidrólise ácida.

Tabela 6. Razão (R) entre as áreas dos cromatogramas do pico de cadeias uni-ramificadas (pico 2) para o pico de cadeias lineares (pico 1) dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Antes do ‘annealing’			Após ‘annealing’		
	3 dias	9 dias	18 dias	3 dias	9 dias	18 dias
Milho normal	0,68	0,51	0,45	0,70	0,58	0,51
Milho ceroso	0,65	0,44	0,39	0,69	0,49	0,41
Mand-salsa	0,27	0,26	0,25	0,28	0,25	0,26
Mandioca	0,67	0,48	0,43	0,73	0,57	0,47
Batata	0,34	0,24	0,21	0,32	0,24	0,22

Os valores de R, antes e após ‘annealing’, dos amidos de mandioquinha-salsa praticamente não se alteraram como tempo de hidrólise, mas diminuíram para os demais amidos. Estes resultados sugerem que para o amido de mandioquinha-salsa as cadeias uni-

ramificadas permaneceram protegidas na estrutura cristalina dos amidos, mesmo com a alta taxa de hidrólise apresentada para este amido (Figura 1). Para os demais amidos, a redução de R, sugere que a degradação das regiões cristalinas expôs os pontos de ramificação presentes nas lamelas cristalinas.

Os maiores valores de R obtidos após ‘annealing’ para os amidos de milho normal, milho ceroso e mandioca (Tabela 4) sugerem que a discreta organização estrutural provocada pelo ‘annealing’ protegeu dos pontos de ramificação presentes nas lamelas cristalinas de amidos tipo A. Este efeito protetor não foi observado para os amidos de mandioquinha-salsa e batata que apresentam padrão cristalino tipo B.

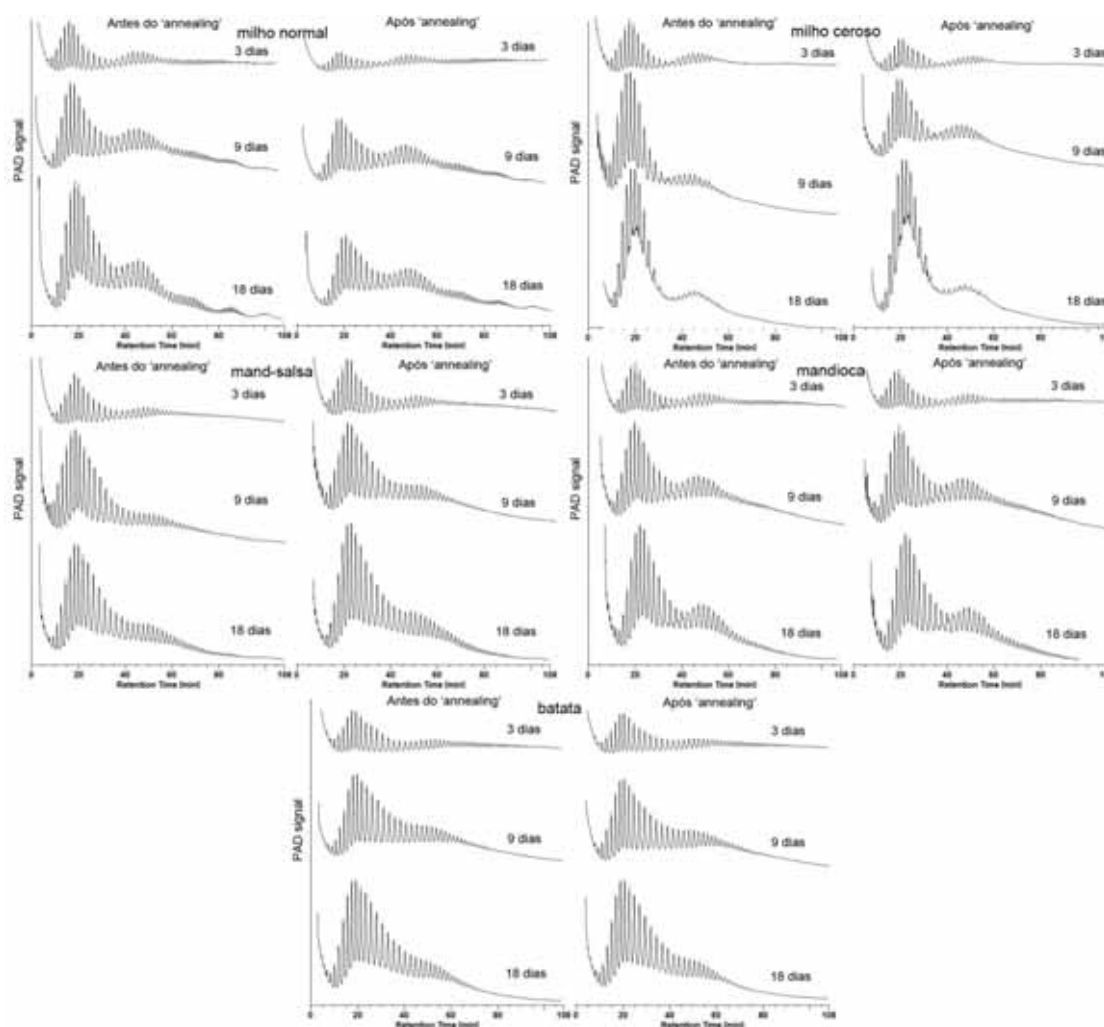


Figura 13. Cromatogramas de HPAEC-PAD dos amidos submetidos à hidrólise ácida obtidos após 3, 9 e 18 dias de hidrólise, sem desramificar.

Na Figura 13, é possível observar que com o decorrer da hidrólise, a intensidade dos picos das amilopectinas sem desramificar aumentou. Em estudo desenvolvido por Jane, Wong e McPherson (1997), dextrinas Naegeli, obtidas de amidos com polimorfismo tipo A e tipo B, foram analisados através de um sistema HPAEC-ENZ-PAD (cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção de pulso amperométrico, acoplado a um reator de amiloglicosidase pós-coluna). Neste sistema, o reator enzimático pós-coluna permitiu a visualização de um ou mais picos além dos dois observados neste trabalho. Estes outros picos corresponderiam às cadeias com múltiplas ramificações. Desta forma, é possível sugerir que o aumento na intensidade dos picos com o tempo de hidrólise observado neste trabalho possa ser devido à degradação de cadeias com múltiplas ramificações que passaram a ser lineares ou uni-ramificadas.

3.4. Difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade

Os amidos submetidos à hidrólise ácida por 0, 3, 9 e 18 dias foram avaliados quanto à difração de raios-X e porcentagem de cristalinidade (Figura 14 e Tabela 7). O padrão de difração de raios-X dos amidos de milho normal, milho ceroso, mandioquinha-salsa, mandioca e batata foram tipos A, A, B, C_A e B, respectivamente, como observado em trabalhos anteriores (ROCHA et al., 2010a (capítulo 3); ROCHA et al., 2010b (capítulo 4)). Estes padrões não foram alterados pela ação do ácido nos diversos tempos de hidrólise.

A intensidade dos picos e a área amorfa dos difractogramas diminuíram para todos os amidos, independentemente do ‘annealing’ (Figura 14). Para os amidos de mandioquinha-salsa, nativo e submetido ao ‘annealing’, pode-se observar que a partir de 9 dias de hidrólise, os picos a 18°, 23°, 24° e 26° em 2 θ , foram atenuados, evidenciando maior degradação das regiões cristalinas.

A porcentagem de cristalinidade dos amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata nativos aumentou até 9 dias de hidrólise e reduziu com 18 dias de tratamento, com exceção do amido de milho normal que apresentou aumento na cristalinidade com 18 dias de hidrólise (Tabela 7). O amido de batata apresentou aumento na porcentagem de cristalinidade apenas a partir de 9 dias de tratamento ácido, em função de sua maior resistência ao ácido quando comparado aos demais amidos. O aumento progressivo da cristalinidade dos grânulos de amido pode ser atribuído à hidrólise preferencial das regiões amorfas dos grânulos tornando o resíduo mais cristalino. A redução da cristalinidade dos resíduos com 18 dias de

hidrólise ácida indica que parte da estrutura cristalina é também degradada. A queda na porcentagem de cristalinidade foi mais pronunciada para o amido de mandioquinha-salsa devido à maior suscetibilidade deste amido ao ácido.

Tabela 7. Porcentagem de cristalinidade dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Antes do ‘annealing’				Após ‘annealing’			
	0 dias	3 dias	9 dias	18 dias	0 dias	3 dias	9 dias	18 dias
Milho normal	32,6 ^e	39,7 ^d	49,2 ^b	53,5 ^a	33,7 ^e	44,3 ^c	48,3 ^b	51,1 ^b
Milho ceroso	41,4 ^f	48,7 ^d	54,8 ^b	52,9 ^{bc}	44,3 ^e	49,6 ^d	57,0 ^a	56,2 ^a
Mand-salsa	37,1 ^d	42,1 ^c	50,6 ^b	34,6 ^e	43,1 ^c	32,8 ^f	57,8 ^a	39,2 ^{cd}
Mandioca	36,2 ^e	42,5 ^d	54,4 ^b	52,2 ^c	37,0 ^e	44,3 ^d	60,3 ^a	54,1 ^b
Batata	38,3 ^d	37,1 ^d	44,5 ^a	41,8 ^{bc}	41,1 ^c	42,5 ^b	43,3 ^a	36,9 ^{de}

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

O ‘annealing’ provocou aumento da cristalinidade dos amidos de milho ceroso, mandioquinha-salsa e batata em relação aos amidos nativos devido à maior interação entre amilopectina/amilopectina ocasionadas pela discreta reorganização da estrutura granular (ROCHA et al. (2010a) (capítulo 3); ROCHA et al. (2010b) (capítulo 4)). Esta cristalinidade também foi maior com o tempo de hidrólise, até 9 dias de tratamento e então reduziu, com exceção do amido de mandioquinha-salsa que mostrou redução na cristalinidade com 3 dias de hidrólise, aumento pronunciado com 9 dias e novamente pronunciada redução com 18 dias de tratamento. Por outro lado, o amido de batata mostrou discreto aumento na cristalinidade até 9 dias de tratamento e pronunciada queda no décimo oitavo dia.

A maior suscetibilidade das áreas amorfas dos grânulos provocada pelo ‘annealing’ (Figura 1) promoveu a obtenção de um material mais cristalino. Com 18 dias de hidrólise, foi observada queda na porcentagem de cristalinidade dos amidos de mandioquinha-salsa, mandioca e batata, assim como foi observado para os amidos nativos, o que sugere que as interações amilopectina/amilopectina formadas durante ‘annealing’ (ROCHA et al. (2010a) (capítulo 3); ROCHA et al. (2010b) (capítulo 4)) não resistiram à ação prolongada do ácido.

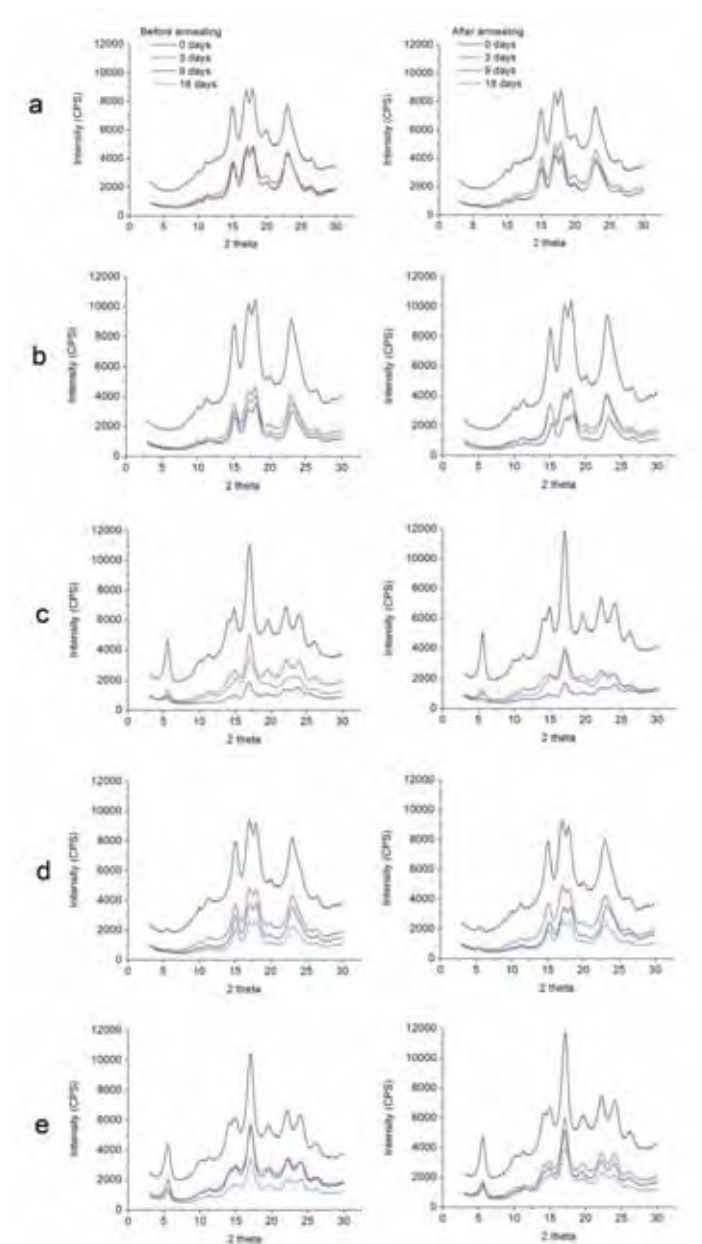


Figura 14. Difractogramas de raios-X dos amidos submetidos á hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’. (a) milho normal; (b) milho ceroso; (c) mandioca-salsa; (d) mandioca; (e) batata.

3.5. Teor de amilose aparente

O teor de amilose aparente dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’, está apresentado na Tabela 8. O ‘annealing’ não alterou o teor de amilose dos

amidos uma vez que a mesma não foi lixiviada dos grânulos, conforme apresentado por Rocha et al. (2010a) (capítulo 3) e Rocha et al. (2010b) (capítulo 4). O teor de amilose aparente caiu drasticamente para todos os amidos já no terceiro dia de hidrólise mostrando que a ação hidrolítica do ácido neste momento se concentrou nas regiões amorfas dos grânulos de amido (JACOBS; DELCOUR, 1998). No entanto, para o amido de milho normal, esta redução foi mais sutil do que a dos demais amidos, neste período. A degradação mais lenta das moléculas de amilose deste amido pode ter resultado no aumento contínuo de sua porcentagem de cristalinidade (Tabela 7) e com isso, as áreas cristalinas foram menos atacadas. Isso também pode ser observado a partir das micrografias deste amido (Figura 2). Os grânulos de amido de milho normal ainda mostravam-se corroídos e quebradiços com 9 dias de hidrólise, enquanto os outros amidos já apresentavam a estrutura típica de cristais. Também pode ser observada na Figura 1 uma taxa mais lenta de hidrólise nos primeiros nove dias.

O amido de milho normal é o único, neste estudo, que apresenta amilose complexada com lipídeos (ROCHA; JANE; FRANCO, s.d. (capítulo 2)). A lenta redução no teor de amilose observada para este amido, durante a hidrólise ácida, pode ser devido à dificuldade do ácido atuar sobre estes complexos.

A redução no teor de amilose aparente do amido de milho ceroso, provavelmente seja devido à intensa degradação das cadeias muito longas destes amidos, como observado por HPAEC-PAD (Tabela 4), que se complexam com o iodo e superestimam o teor de amilose aparente.

Tabela 8. Teor de amilose aparente dos amidos submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	Antes do ‘annealing’				Após ‘annealing’			
	0 dias	3 dias	9 dias	18 dias	0 dias	3 dias	9 dias	18 dias
Milho normal	27,9 ^a	20,6 ^b	12,8 ^f	15,4 ^{cd}	28,1 ^a	16,6 ^c	14,1 ^e	15,0 ^d
Milho ceroso	1,0 ^a	0,3 ^b	0,2 ^b	0,3 ^b	1,0 ^a	0,4 ^b	0,3 ^b	0,4 ^b
Mand-salsa	20,0 ^a	5,4 ^d	5,6 ^d	9,3 ^b	20,3 ^a	5,3 ^d	4,8 ^d	7,8 ^c
Mandioca	23,2 ^a	7,0 ^{cd}	7,4 ^c	3,6 ^e	23,4 ^a	10,6 ^b	6,6 ^d	3,8 ^e
Batata	30,4 ^a	11,1 ^b	5,5 ^c	2,2 ^e	30,3 ^a	11,5 ^c	3,4 ^d	1,7 ^e

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os teores de amilose aparente dos amidos de milho normal e mandioquinha-salsa nativos aumentaram com 18 dias de hidrólise. Neste mesmo período de hidrólise, também foi

observado aumento na proporção de cadeias muito longas da amilopectina ($DP \geq 37$) (Tabelas 1 e 3) para estes amidos. Isto pode ser devido à provável degradação de algumas cadeias laterais mais externas de amilopectina, que se encontravam na superfície dos cristais (JANE et al., 1997). Estes resultados sugerem que a capacidade de complexação dessas cadeias muito longas com iodo superestimou o teor de amilose dos resíduos da hidrólise ácida destes amidos. Resultados similares foram obtidos para dextrinas Naegeli de amido de mandioca-salsa em trabalho conduzido por Campanha (2010).

Após o ‘annealing’, a redução do teor de amilose aparente foi mais intenso com 3 dias de tratamento ácido para o amido de milho normal e com 9 dias para os amidos de mandioca e batata. Estes resultados concordam com estudos prévios que mostraram que o ‘annealing’ expôs mais as moléculas de amilose destes amidos à ação de enzimas (ROCHA et al. (2010a) (capítulo 3); ROCHA et al. (2010b) (capítulo 4)). Assim, o tratamento hidrotérmico provocou maior suscetibilidade das regiões amorfas dos grânulos, onde as moléculas de amilose estão principalmente localizadas, resultando nas maiores taxas de hidrólise neste período (Figura 1).

3.6. Propriedades térmicas

Os amidos nativos e submetidos ao ‘annealing’ após os diferentes tempos de hidrólise ácida foram avaliados quanto às suas propriedades térmicas (Tabelas 9 a 13). O amido de milho normal nativo apresentou com 3 dias de tratamento ácido, queda nas temperaturas de início (T_0) e de pico (T_p) de gelatinização e na variação de entalpia (ΔH). A ação do ácido nas regiões amorfas dos grânulos, demonstrada pela queda no teor de amilose aparente deste amido (Tabela 8), foi mais lenta que para os demais amidos. Desta forma, pode ter ocorrido a formação de cristais mais heterogêneos e com menor estabilidade provocada pela ação do ácido sobre as cadeias longas da amilopectina (Tabela 1), resultando na queda destes parâmetros. A maior heterogeneidade dos cristais foi refletida na larga faixa de temperaturas de gelatinização (ΔT) observada para este amido. Com o decorrer da hidrólise, as temperaturas de gelatinização se tornaram maiores em função da maior degradação das moléculas de amilose, o que também provocou aumento na porcentagem de cristalinidade deste amido (Tabela 8).

A maior exposição das moléculas de amilose ao ácido provocada pelo ‘annealing’ resultou na formação de cristais menos heterogêneos em relação ao amido nativo após 3 dias de hidrólise. Desta forma, foram observadas maiores temperaturas de início de gelatinização e

menor ΔT . Como não houve alteração no perfil de distribuição das cadeias da amilopectina (Tabela 1) entre o amido nativo e submetido ao ‘annealing’, os valores de ΔH também reduziram neste período. No entanto, ligeiro aumento no ΔH foi observado com 18 dias de tratamento ácido. É possível que a maior degradação das moléculas de amilose tenha propiciado uma maior estabilidade dos cristais deste amido.

Tabela 9. Propriedades térmicas dos amidos de milho normal submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	T ₀ [*] (°C)	T _p [*] (°C)	T _f [*] (°C)	ΔT [*] (°C)	ΔH [*] (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0 dias	65,73 ^c	69,54 ^d	73,50 ^g	7,77	12,1 ^a
3 dias	53,86 ^e	68,59 ^d	85,12 ^c	31,26	3,8 ^b
9 dias	60,15 ^d	72,90 ^c	90,91 ^b	30,76	3,7 ^b
18 dias	69,75 ^b	82,50 ^a	92,18 ^a	22,43	3,1 ^b
Após ‘annealing’					
0 dias	71,03 ^a	73,51 ^c	75,81 ^f	4,78	12,7 ^a
3 dias	60,49 ^d	72,68 ^c	79,67 ^e	19,18	1,7 ^d
9 dias	64,64 ^c	73,40 ^c	83,67 ^{cd}	19,03	1,9 ^d
18 dias	69,07 ^b	80,03 ^b	92,20 ^a	23,13	2,8 ^c

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔT = T_f - T₀; ΔH = variação de entalpia, nd = não detectado.

O amido de milho ceroso nativo, assim como o amido de milho normal, também apresentou queda nas temperaturas de início e de pico de gelatinização e no ΔH com 3 dias de hidrólise ácida. Após 3 dias de tratamento ácido, os valores de ΔH voltaram a aumentar sugerindo que, apesar da alta degradação das cadeias ramificadas da amilopectina (Tabela 2), os cristais remanescentes apresentavam maior perfeição e maior energia era necessária para sua fusão. Após o tratamento hidrotérmico não foi observado alteração do perfil endotérmico comparado ao amido de milho ceroso nativo nos diferentes tempos de hidrólise.

O amido de mandioquinha-salsa nativo também apresentou após 3 dias de tratamento ácido, queda nas temperaturas de início e de pico de gelatinização e na variação de entalpia. A rápida ação do ácido nas regiões amorfas dos grânulos, representada pela significativa queda no teor de amilose aparente deste amido (Tabela 8), resultou em uma maior concentração das regiões cristalinas (KISELEVA et al., 2005). Desta forma, seria esperado, além do aumento na porcentagem de cristalinidade dos amidos, como observado na Tabela 7, aumento nas temperaturas de gelatinização e no ΔH . No entanto, a diminuição do valor desses parâmetros pode ser devido à maior concentração de cristais mais heterogêneos e com menor estabilidade

provocada por defeitos na estrutura cristalina deste amido (Figura 4), o que justificaria também o expressivo aumento da faixa de temperaturas de gelatinização (ΔT) deste amido.

Tabela 10. Propriedades térmicas dos amidos de milho ceroso submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	T_0^* (°C)	T_p^* (°C)	T_f^* (°C)	ΔT^* (°C)	ΔH^* (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0 dias	64,90 ^b	70,68 ^c	76,34 ^e	11,44	13,4 ^b
3 dias	53,31 ^d	69,12 ^d	91,08 ^b	37,77	2,8 ^g
9 dias	65,08 ^b	81,86 ^a	92,08 ^{ab}	27,00	4,2 ⁱ
18 dias	50,74 ^e	68,81 ^d	86,03 ^c	35,29	8,4 ^d
Após ‘annealing’					
0 dias	70,04 ^a	73,53 ^b	77,60 ^e	7,56	15,4 ^a
3 dias	56,09 ^c	60,04 ^e	67,36 ⁱ	11,27	1,4 ^h
9 dias	64,41 ^b	81,35 ^a	94,12 ^a	29,71	5,8 ^e
18 dias	50,17 ^e	71,37 ^c	83,25 ^d	33,08	9,5 ^c

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ^{*} T_0 , T_p , T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; $\Delta T = T_f - T_0$; ΔH = variação de entalpia, nd = não detectado.

O aumento das temperaturas de gelatinização nos tempos seguintes de hidrólise sugere que os defeitos na estrutura cristalina foram sendo progressivamente degradados pelo ácido formando cristais mais perfeito e homogêneos, que também resultou em diminuição do ΔT . No entanto, a redução do ΔH dos amidos durante todo o período de hidrólise, sugere degradação de algumas áreas cristalinas.

Após o ‘annealing’, o amido de mandioquinha-salsa apresentou quedas mais expressivas das temperaturas de gelatinização o que reforça a possibilidade de o tratamento hidrotérmico ter provocado uma maior exposição dos defeitos na estrutura cristalina destes amidos.

Os amidos de mandioquinha-salsa nativo e submetido ao ‘annealing’ não apresentaram endoterma de gelatinização após 18 dias de tratamento ácido. Estes resultados concordam com o observado na difração de raios-X, onde os picos do difractograma (Figura 14) foram atenuados e a porcentagem de cristalinidade diminuiu (Tabela 8), indicando intensa degradação das regiões cristalinas sofrida por este amido.

O amido de mandioca nativo, assim como os amidos de milho normal, milho ceroso e mandioquinha-salsa, mostrou queda nas temperaturas de gelatinização e no ΔH com 3 dias de hidrólise ácida, sugerindo que degradação das áreas amorfas (Tabela 8) provocou maior

concentração de cristais heterogêneos e com defeitos na sua estrutura. Nos tempos de hidrólise seguintes, as temperaturas de gelatinização aumentaram devido à formação de cristais mais perfeitos. No entanto, o ΔH continuou diminuindo, sugerindo a degradação das áreas cristalinas (Tabela 12).

Tabela 11. Propriedades térmicas dos amidos de mandioquinha-salsa submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	T ₀ [*] (°C)	T _p [*] (°C)	T _f [*] (°C)	ΔT [*] (°C)	ΔH [*] (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0 dias	56,99 ^c	60,29 ^c	64,42 ^e	7,43	16,8 ^b
3 dias	46,59 ^e	59,37 ^d	72,06 ^b	25,47	11,5 ^c
9 dias	58,81 ^b	68,42 ^a	76,49 ^a	17,68	2,3 ^d
18 dias	nd ⁻	nd ⁻	nd ⁻	nd ⁻	nd ⁻
Após ‘annealing’					
0 dias	61,85 ^a	64,45 ^b	67,40 ^d	5,55	17,8 ^a
3 dias	51,25 ^d	60,59 ^c	70,47 ^c	19,22	10,4 ^c
9 dias	58,95 ^b	68,65 ^a	77,20 ^a	18,25	2,8 ^d
18 dias	nd ⁻	nd ⁻	nd ⁻	nd ⁻	nd ⁻

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; $\Delta T = T_f - T_0$; ΔH = variação de entalpia, nd = não detectado.

Com o tratamento hidrotérmico foi observado maior queda na temperatura inicial de gelatinização do amido de mandioca em relação ao amido nativo, o que comprova a maior exposição dos defeitos na estrutura cristalina deste amido após ‘annealing’.

Para o amido de batata nativo uma queda na temperatura inicial de gelatinização foi observada até 9 dias de hidrólise e o ΔH diminuiu porém mais sutilmente do que os demais amidos, provavelmente devido à menor taxa de hidrólise apresentada por este amido (Tabela 13). No entanto, ao contrário do observado para os outros amidos, houve aumento da temperatura de pico durante todo o período de hidrólise deste amido, o que indica que os cristais obtidos durante o tratamento ácido apresentavam maior estabilidade e menor quantidade de defeitos, e desta forma maiores temperaturas foram necessárias para a sua fusão. Após o tratamento hidrotérmico, a temperatura inicial de gelatinização reduziu com 3 dias de hidrólise e voltou a aumentar a partir de então, provavelmente devido à maior exposição das moléculas de amilose provocada pelo ‘annealing’. O tratamento hidrotérmico deste amido não resultou em alterações significativas nas propriedades térmicas durante os diferentes tempos de hidrólise ácida.

Tabela 12. Propriedades térmicas dos amidos de mandioca submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	T ₀ [*] (°C)	T _p [*] (°C)	T _f [*] (°C)	ΔT [*] (°C)	ΔH [*] (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0 dias	59,10 ^d	67,28 ^e	74,63 ^e	15,53	13,6 ^a
3 dias	49,53 ^e	60,06 ^f	80,56 ^d	31,03	4,8 ^b
9 dias	64,69 ^c	77,17 ^{bc}	90,81 ^b	26,12	2,7 ^c
18 dias	73,81 ^a	85,81 ^a	92,96 ^a	19,15	2,4 ^c
Após ‘annealing’					
0 dias	65,30 ^c	69,28 ^d	74,25 ^e	8,95	13,9 ^a
3 dias	51,10 ^e	66,32 ^e	82,83 ^c	31,73	4,9 ^b
9 dias	64,25 ^c	74,98 ^c	90,92 ^b	26,67	2,5 ^c
18 dias	69,73 ^b	81,09 ^b	91,17 ^{ab}	21,44	1,7 ^d

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔT = T_f - T₀; ΔH = variação de entalpia.

Tabela 13. Propriedades térmicas dos amidos de batata submetidos à hidrólise ácida, antes e após ‘annealing’.

Amidos	T ₀ [*] (°C)	T _p [*] (°C)	T _f [*] (°C)	ΔT [*] (°C)	ΔH [*] (J/g)
Antes do ‘annealing’					
0 dias	62,04 ^b	64,75 ^d	68,59 ^e	6,55	15,5 ^b
3 dias	56,94 ^d	70,14 ^{bc}	83,11 ^b	26,17	12,0 ^c
9 dias	54,15 ^e	69,50 ^{bc}	83,32 ^b	29,17	10,5 ^{de}
18 dias	60,30 ^c	73,38 ^{ab}	86,30 ^a	26,00	8,8 ^{et}
Após ‘annealing’					
0 dias	67,71 ^a	69,93 ^{bc}	72,91 ^d	5,20	17,9 ^a
3 dias	54,19 ^e	68,82 ^c	81,86 ^c	27,67	11,4 ^{cd}
9 dias	57,00 ^d	71,59 ^b	83,03 ^b	26,03	9,1 ^e
18 dias	61,28 ^{bc}	74,63 ^a	87,47 ^a	26,19	8,2 ^f

^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05); ^{*} T₀, T_p, T_f = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔT = T_f - T₀; ΔH = variação de entalpia.

4. CONCLUSÃO

A cinética de hidrólise ácida apresentou duas fases distintas para todos os amidos. O ácido atacou mais rapidamente as regiões amorfas, diminuindo o teor de amilose dos amidos, e mais lentamente as regiões cristalinas, provocando gradual degradação das moléculas de

amilopectina. O amido de mandioquinha-salsa foi o mais suscetível à hidrólise, seguido dos amidos de milho ceroso, mandioca e milho normal. O amido de batata foi o mais resistente. Os grânulos dos amidos foram inicialmente atacados por exocorroção e, com maior tempo de hidrólise, estruturas com formatos poligonais, superfícies facetadas e extremidades pontiagudas, típicas de material cristalino, foram formadas. O ácido clorídrico atacou as cadeias de amilopectina dos amidos degradando principalmente as cadeias longas e provocando aumento na proporção de cadeias com DP 13-24, que apresentam tamanho ideal para a formação de duplas hélices mais perfeitas e melhor empacotadas e, por isso, foram mais resistentes ao ácido. A degradação das moléculas de amilopectina provocou queda no ΔH de gelatinização dos amidos devido à maior heterogeneidade dos cristais. Para o amido de milho ceroso prolongando-se o tempo de hidrólise, apesar do intenso ataque do ácido a suas amilopectinas, o ΔH aumentou sugerindo formação de cristais mais perfeitos. O ataque do ácido às regiões amorfas dos grânulos resultou nos primeiros 9 dias de tratamento em maior porcentagem de cristalinidade dos resíduos da hidrólise, que diminuiu com 18 dias devido ao ataque das regiões cristalinas, com exceção do amido de milho normal.

O tratamento hidrotérmico modificou o perfil de hidrólise dos amidos, tornando as regiões amorfas dos amidos mais suscetíveis na primeira fase de hidrólise em função da maior degradação das moléculas de amilose, o que resultou na obtenção de um material mais cristalino. O amido de milho normal ainda apresentou maior resistência durante a segunda fase. O ‘annealing’ resultou em maior resistência das cadeias com DP 13-24 foi observada para o amido de milho ceroso, porém essas cadeias se tornaram mais suscetíveis para o amido de mandioca. Já para o amido de mandioquinha-salsa as cadeias com DP 6-12 foram mais atacadas devido à maior exposição dos defeitos de sua estrutura cristalina. Diferenças no perfil de degradação das cadeias da amilopectina não foram observadas para os amidos de milho normal e batata. No entanto, para os amidos de milho normal, milho ceroso e mandioca, o tratamento hidrotérmico promoveu maior proteção dos pontos de ramificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILIADERIS, C. G. Structural transitions and related physical properties of starch. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: chemistry and technology**. Burlington: Academic Press. 2009. p. 293-372. 3a. ed.
- CAMPANHA, R B. **Característica físico-químicas turais de amidos nativos e suas dextrinas Naegeli**. São José do Rio Preto, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), IBILCE – UNESP.
- 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.
- FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.
- GENKINA, N. K.; WASSERMAN, L. A.; YURYEV, V. P. Annealing of starches from potato tubers grown at different environmental temperatures. Effect of heating duration. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 367-370, 2004.
- 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.
- Hoover, R., & Vasanthan, T. (1994). The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 303-325.
- HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food Reviews International**, v. 16, n. 3, p. 369-392, 2000.
- 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, 1998a.
- JACOBS, H.; DELCOUR, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 2895-2904, 1998.
- JANE, J. L.; WONG, K. S.; MCPHERSON, A. E. Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray 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. Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 629-637, 1999.
- JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 3, p. 205-213, 2006.
- JAYAKODY, L.; HOOVER, R. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 691-703, 2008.
- JAYAKODY, L.; HOOVER, R.; LIU, Q.; DONNER, E. Studies on tuber III. Impact of annealing on the molecular structure, composition and physicochemical properties of yam (*Discorea* sp.) starches grown in Sri Lanka. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 145-153, 2009.
- KASEMSUWAM, 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.
- KISELEVA, V. I.; KRIVANDIN, A. V.; FORMAL, J.; BLASZCZAK, W.; JELINSKI, T.; YURYEV, V. P. Annealing of normal and mutant wheat starches. LM, SEM, DSC, and SAXS studies. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 1, p. 75-83, 2005.
- LAN, H.; HOOVER, R.; JAYAKODY, L.; LIU, Q.; BAGA, M.; ASARE, E. K.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Impact of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of normal, waxy and high amylose bead wheat starches. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 663-675, 2008.
- NAKAZAWA, Y.; WANG, Y. J. Acid hydrolysis of native and annealed starches and branch-structure of their Naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 24, p. 2871-2882, 2003.
- 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.
- PERRY, P. A.; DONALD, A. M. SANS study of the distribution of water within the starch granules.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 28, n. 1, p. 31-39, 2000.

ROCHA, T. S.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Caracterização físico-química e estrutural de amidos de diferentes fontes botânicas, 28 p. Trabalho não publicado.

ROCHA, T. S.; CUNHA, V. A. G.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Structural characterization of Peruvian carrot starch and effect of annealing on its semi-crystalline structure. **Carbohydrate Polymers**, *submetido*, 2010.

ROCHA, T. S.; FELIZARDO, S. G.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Effect of annealing on the semi-crystalline structure of normal and waxy corn starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *submetido*, 2010.

ROCHA, T. S.; HAMMOND, A. L. C.; FRANCO, C. M. L. Efeito do ‘annealing’ sobre a suscetibilidade enzimática de amidos de raízes e tubérculos, 30 p. Trabalho não publicado.

SRICHUWONG, S.; ISONOTO, 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, n. 3, p. 115-121, 2005.

TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; KARKALAS, J. Annealing of wheat starch. **Journal of Cereal Science**, v. 28, n. 3, p. 259-272, 1998.

WADUGE, R. N.; HOOVER, R.; VASANTHAN, T. Effect of annealing on the structure and physicochemical properties of barley starches of varying amylose content. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 59-77, 2006.

WONG, K. S.; JANE, J. Effects of pushing agents on the separation and detection of debranched amylopectin by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 1, p. 63-80, 1995.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos permitiram verificar que o amido de mandioquinha-salsa apresenta características estruturais peculiares diferentes das dos outros amidos estudados. Este amido apresenta polimorfismo tipo B, possui grande quantidade tanto de cadeias laterais curtas como de cadeias laterais muito longas da amilopectina e apresenta grânulos frágeis e quebradiços provavelmente devido a uma estrutura cristalina frágil.

Após ‘annealing’, verificou-se que os amidos de milho ceroso, mandioquinha-salsa e batata apresentaram aumento da porcentagem de cristalinidade. Estes resultados são indicativos de que a estrutura destes amidos estava mais propensa à reorganização provocada pelo tratamento hidrotérmico. O rearranjo estrutural provocado pelo ‘annealing’ promoveu uma maior exposição das moléculas de amilose à ação das enzimas e do ácido e estas passaram a ser mais degradadas. O tratamento hidrotérmico também aumentou a interação das moléculas de amilopectina em função da maior ordem cristalina, o que resultou em um efeito protetor das cadeias longas da amilopectina do amido de mandioquinha-salsa à ação das enzimas e maior exposição dos defeitos de sua estrutura cristalina à ação do ácido. Esta maior interação também promoveu proteção dos pontos de ramificação presentes nas lamelas cristalinas dos amidos de milho normal, milho ceroso e mandioca à hidrólise ácida. Maior resistência das cadeias com DP 13-24 do amido de milho ceroso também foi observada. No entanto, estas cadeias se tornaram mais suscetíveis à hidrólise enzimática, para os amidos de mandioca e batata, e à hidrólise ácida para o amido de mandioca.